

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Mgr. Lenka Monincová

Antimikrobiální peptidy izolované z jedu blanokřídlého hmyzu

Antimicrobial peptides isolated from the venom of hymenopterous
insect

Dizertační práce

Školitel: RNDr. Václav Čerovský, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení autora:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Mgr. Lenka Monincová

Prohlášení školitele:

Prohlašuji, že Mgr. Lenka Monincová rozhodujícím způsobem přispěla ke vzniku všech 4 odborných publikací, které jsou přílohami této dizertační práce. Sama provedla většinu experimentů a významně se podílela na jejich plánování, na interpretaci výsledků a na sepsání publikací.

V Praze dne

RNDr. Václav Čerovský, CSc.

Poděkování

Úvodem bych ráda poděkovala svému školiteli Václavu Čerovskému za odborné vedení, cenné rady a připomínky. Poděkování patří také všem současným i bývalým členům skupiny Václava Čerovského na ÚOCHB AV ČR, v.v.i., kteří mi pomáhali během doktorandského studia. Hlavně děkuji Haně Hulačové, Jiřině Slaninové, Lence Borovičkové, Vladimíru Fučíkovi, Ondřeji Nešutovi a Sabině Čujové.

Dále děkuji členům ostatních týmů z ÚOCHB AV ČR, v.v.i., se kterými jsem spolupracovala, za jejich pomoc a rady. Především děkuji Josefu Cvačkovi, Václavu Veverkovi, Miloši Buděšínskému, Lucii Bednárové, Petru Maloňovi, Zdeňkovi Voburkovi, Oldřichu Hovorkovi a Jitce Štokrové.

Také děkuji týmu hmotnostní spektrometrie z ÚOCHB AV ČR, v.v.i. za poskytnutí přístrojů a rad pro měření hmotnostních spekter.

Děkuji Jakubovi Strakovi z Katedry zoologie, UK v Praze a Petru Šrůtkovi z České zemědělské univerzity v Praze za poskytnutí cenného biologického materiálu.

Dále bych ráda vyjádřila poděkování celému ÚOCHB AV ČR, v.v.i. za vytváření inspirativního prostředí a skvělého zázemí pro vědeckou práci.

Na závěr moc děkuji své rodině a přátelům.

Tato práce byla provedena v rámci grantu GAČR 203/08/0536 a v rámci výzkumného záměru ÚOCHB AV ČR, v.v.i. Z40550506 a RVO 61388963

Abstrakt

S ohledem na stále narůstající rezistenci a multirezistenci mikrobů vůči tradičním antibiotikům je nezbytný vývoj nových antimikrobiálních látek. Mezi nadějně kandidáty již několik let patří antimikrobiální peptidy (AMP). Jejich výhodou je rychlé a selektivní působení na prokaryotní buňku. Jejich účinek ve většině případů spočívá v narušení mikrobiální membrány, které vede ke smrti buňky. Bohatým zdrojem AMP se ukázal být jed blanokřídlého hmyzu.

Z jedu divoce žijících včel bylo izolováno několik nových AMP. Podrobnější výzkum je věnován halictinům (HAL-1 a HAL-2) z ploskočelky šestipásé, lasiocepsinu (Las) z ploskočelky velkohlavé a macropinu (MAC-1) z olejnice žlutohého. Jsou aktivní proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím a proti kvasince *Candida albicans*. Liší se v hemolytické aktivitě. Zatímco halictiny a macropin mají značnou hemolytickou aktivitu, Las není hemolytický. Nový AMP byl izolován také ze sekretu pilořítky olšové. Jedná se o nový hmyzí defensin složený z 55 aminokyselin, který je na C-konci amidovaný a obsahuje tři disulfidické můstky.

Výsledky CD a NMR studií ukázaly schopnost HAL-1, HAL-2 a MAC-1 vytvářet v přítomnosti micel dodecylsulfátu sodného nebo organického rozpouštědla trifluoroethanolu amfipatickou α -helikální strukturu. Pro studium vztahu struktury a biologické aktivity jsme připravili řadu analogů peptidů HAL-1, HAL-2 a MAC-1. Sledovali jsme vliv kationicity, α -helicity, hydrofobicity nebo amfipaticity na antimikrobiální a hemolytickou aktivitu. Analogy se zvýšeným kladným nábojem patří mezi ty nejslibnější. Vykazovaly zvýšenou antimikrobiální aktivitu proti některým patogenním bakteriím a zároveň nižší hemolytickou aktivitu. V případě MAC-1 se ukázalo, že vhodně zvolené modifikace v N-koncové části sekvence vedou ke zvýšení stability peptidu v krevním séru oproti přírodnímu MAC-1.

Las je cyklický peptid, jehož terciální struktura je složena ze dvou α -helixů spojených smyčkou. Struktura celé molekuly je stabilizovaná dvěma disulfidickými můstky. Strukturně-aktivitní studie ukázala, že disulfidické můstky jsou důležité pro udržení optimální terciální struktury, která je zásadní pro působení na bakteriální membránu.

Mechanismus účinku HAL-1 a Las jsme studovali jednak na modelových membránách vytvořených v podobě vezikul o různém složení a jednak na buňkách bakterie *E.coli*. Oba peptidy silně interagovaly s dvouvrstvou anionických vezikul a docházelo i k jejich zanoření do této dvouvrstvy. Interakce i hloubka zanoření se zvyšovala s obsahem kardiolipinu v dvouvrstvě. Oba dva peptidy narušovaly jak vnější, tak i vnitřní membránu *E.coli*.

Abstract

Rapid development of bacterial resistance and multiresistance to conventional antibiotics has resulted in an intensive search for alternative antimicrobial agents. Antimicrobial peptides (AMPs) belong to promising anti-infective candidates since they do not develop bacterial resistance. They kill microbes by disturbing or permeabilizing the cytoplasmic membrane, or may target putative key intracellular compartments. Their advantages include fast action and selectivity between prokaryotic and eukaryotic cells.

We have isolated several novel AMPs from the venom of wild bees: halictines (HAL-1 and HAL-2) from *Halictus sexcinctus*, lasiocepsin (Las) from *Lasioglossum laticeps* and macropin (MAC-1) from *Macropis fulvipes*. They are active against Gram-positive and Gram-negative bacteria and against yeast *Candida albicans*. While halictines and macropin have moderate hemolytic activity, Las shows no hemolytic activity. A novel AMP was isolated also from the mucus of *Xiphydria camelus*. This AMP belongs to the category of insect defensins. It contains 55 amino acid residues, three disulphide bridges and its C-terminus is amidated.

CD and NMR studies of HAL-1, HAL-2 and MAC-1 revealed propensity to form amphipathic α -helical structure in the presence of sodium dodecyl sulfate or trifluoroethanol. For the structure-activity relationship study we synthesized series of HAL-1, HAL-2 and MAC analogs in order to follow effect of cationicity, α -helicity, hydrophobicity or amphipathicity on antimicrobial and hemolytic activity. Peptides with increased positive net charge belong to the most promising analogs. They show increased antimicrobial activity against pathogenic bacteria and lower hemolytic activity. MAC-1 analogs with modification at the N-terminal part of its sequence exhibited better serum stability than natural MAC-1.

Las belongs to the category of cyclic AMPs. Its tertiary structure consists of two α -helices linked by a structured loop. Whole structure is stabilized by two disulfide bridges. Structure-activity relationship studies confirmed the importance of disulfide bridges for stabilization of its tertiary structure that is important for the interaction with bacterial membrane and thus for its antimicrobial activity.

Mechanism of action of HAL-1 and Las was studied on vesicles of various compositions as models of biological membranes or directly on the cells of *E.coli*. Both peptides interacted strongly with the membrane of anionic vesicles simulating bacterial cell membranes and also penetrated into their bilayer. The interaction was further enhanced by increasing concentration of cardiolipin in bilayer of membrane. Both peptides increased permeability of outer and inner membrane of *E.coli*.

Obsah

Obsah	6
Seznam zkratek	8
1. Úvod	10
1.1. Obecné vlastnosti antimikrobiálních peptidů	10
1.2. Mechanismus účinku antimikrobiálních peptidů	12
1.3. Struktura kationických antimikrobiálních peptidů	14
1.3.1. Lineární α -helikální antimikrobiální peptidy	14
1.3.2. Cyklické antimikrobiální peptidy	15
1.3.3. Antimikrobiální peptidy s výrazným zastoupením jedné aminokyseliny	16
1.4. Antimikrobiální peptidy izolované z hmyzu	17
1.4.1. Imunitní systém hmyzu	17
1.4.2. Antimikrobiální peptidy z hemolymfy hmyzu	18
1.4.2.1. Lineární α -helikální antimikrobiální peptidy z hemolymfy hmyzu	18
1.4.2.2. Cyklické antimikrobiální peptidy z hemolymfy hmyzu	19
1.4.2.3. Antimikrobiální peptidy bohaté na prolin z hemolymfy hmyzu	21
1.4.2.4. Antimikrobiální peptidy bohaté na glycin z hemolymfy hmyzu	22
1.4.3. Antimikrobiální peptidy z jedu blanokřídlého hmyzu	23
1.4.3.1. Jedové vččky blanokřídlého hmyzu	23
1.4.3.2. Antimikrobiální peptid z jedu včely medonosné	23
1.4.3.3. Antimikrobiální peptidy z jedu vos, sršňů a čmeláků	25
1.4.3.4. Antimikrobiální peptidy z jedu volně žijících včel	26
1.4.3.5. Antimikrobiální peptidy z jedu mravenců	27
1.5. Strukturně-aktivitní studie antimikrobiálních peptidů	28
1.5.1. Obsah α -helixu v antimikrobiálních peptidech	29
1.5.2. Amfipaticita	29
1.5.3. Náboj peptidu	30
1.5.4. Hydrofobicita	30
1.5.5. Zastoupení aminokyselin v antimikrobiálních peptidech	31
2. Cíle dizertační práce	32
3. Metody	33
3.1. Izolace antimikrobiálních peptidů	33
3.1.1. Izolace antimikrobiálních peptidů z jedových váček	33
3.1.2. Izolace defensinu ze sekretu vosy pilořitky olšové	33
3.2. Identifikace antimikrobiálních peptidů	34
3.2.1. Hmotnostní spektrometrie	34

3.2.2. Edmanovo odbourávání	35
3.2.3. Stanovení disulfidických můstků	35
3.2.4. Štěpení defensinu endoproteinasou Lys-C	35
3.3. Syntéza peptidů	35
3.3.1. Syntéza lineárních peptidů	35
3.3.2. Syntéza peptidů s disulfidickými můstky	36
3.4. Stanovení biologických aktivit	36
3.4.1. Stanovení antimikrobiální aktivity	36
3.4.2. Hemolytická aktivita	37
3.5. Stanovení struktury	37
3.5.1. Cirkulární dichroismus	37
3.5.2. NMR	37
3.6. Stabilita peptidů v séru	37
3.7. Studium vlivu peptidů na buněčné membrány	38
3.7.1. Tvorba lipozómů	38
3.7.2. Měření fluorescence Trp obsaženého v antimikrobiálních peptidech	38
3.7.3. Zhášení fluorescence Trp akrylamidem	38
3.7.4. Stanovení propustnosti vnější a vnitřní membrány bakterie <i>E.c.</i>	39
3.8. Transmisní elektronová mikroskopie	39
4. Výsledky	40
4.1. Halictiny	40
4.1.1. Strukturně-aktivitní studie halictinů	41
4.1.2. Studie interakcí halictinů s membránami	42
4.2. Lasiocepsin	48
4.2.1. Charakterizace lasiocepsinu a jeho strukturně-aktivitní studie	48
4.2.2. Strukturní základy pro antimikrobiální aktivitu lasiocepsinu	50
4.3. Macropin	53
4.4. Defensin z pilořitky olšové	56
5. Diskuze a závěr	61
6. Literatura	68
7. Seznam publikací	86
8. Přílohy	88

Seznam zkratek

ACN	acetonitril
AMP	antimikrobiální peptid(y)
<i>B.s.</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>C.a.</i>	<i>Candida albicans</i>
CD	cirkulární dichroismus
CFU	jednotka tvořící kolonii (<i>colony forming unit</i>)
CL	kardiolipin (<i>cardiolipin</i>)
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DTT	dithiothreitol
<i>E.c.</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fmoc	9-fluorenylmethyloxykarbonyl
Chol	cholesterol
LB agar	Luria-Bertani agar
LPS	lipopolysacharid
LUV	velké jednovrstevné vezikuly (<i>large unilamellar vesicle</i>)
<i>M.l.</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
MeL	<i>N</i> -methyleucin
MIC	minimální inhibiční koncentrace (<i>minimal inhibitory concentration</i>)
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
NPN	1- <i>N</i> -fenylnaftylamin
ONPG	<i>o</i> -nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
Orn	ornitin
<i>P.a.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin
PE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfoethanolamin
PEG	polyethylenglykol
PG	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[fosfo-rac-1-glycerol]
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (<i>reverse phase high performance liquid chromatography</i>)
<i>S.a.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAR	Strukturně-aktivitní studie (<i>structure-activity relationship study</i>)

SDS	dodecylsírán sodný
SE-HPLC	vysokoučinná kapalinová gelová chromatografie (<i>size exclusion high performance liquid chromatography</i>)
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TFA	kyselina trifluoroctová (<i>trifluoroacetic acid</i>)
TFE	2,2,2-trifluoroethanol

1. Úvod

Text úvodu byl využit jako podklad pro článek „Antimikrobiální peptidy izolované z hmyzu“ publikovaný v Chemických listech (2014), 108, 344-353

Mezi největší problémy současné medicíny patří rezistence bakterií k běžně užívaným antibiotikům. Objevení penicilinu Alexandrem Flemingem¹ a zavedení antibiotik do praxe ve 20. století byly bezesporu významným mezníkem v historii moderní medicíny. Avšak již ten samý rok, kdy byl penicilin uveden do klinické praxe, byly objeveny rezistentní kmeny bakterií *Staphylococcus aureus* vůči tomuto antibiotiku². Mnoho bakterií, které se podílely na epidemiích nemocí, se pro nadměru užívání až zneužívání antibiotik vyvinulo do multirezistentní formy. *Staphylococcus aureus* rezistentní na methicilin (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* a další jsou příklady bakterií s častým výskytem kmenů rezistentních k antibiotikům, které zvyšují počet nemocných a komplikují jejich léčbu.

Pro zamezení návratu do doby „předantibiotické“, před kterým odborníci stále častěji varují³, je nezbytný vývoj dalších antimikrobiálních látek a to nejlépe s úplně odlišným mechanismem působení než mají současná antibiotika. Mezi nadějně kandidáty v boji proti bakteriální infekci se stále řadí antimikrobiální peptidy (AMP)^{4,5}. Dlouholetý výzkum těchto účinných látek nepozastavila ani známá historie nadějného Pexigananu (analog AMP magaininu), který neprošel třetí fází klinického výzkumu⁶, a ani fakt, že zatím nebyly AMP zavedeny do praxe. Několik dalších látek odvozených od přírodně se vyskytujících AMP se již nachází v různých fázích klinického testování (např. brilacidin odvozený od defensinu (Cellceutix, USA; <http://cellceutix.com/brilacidin/>) nebo hLF-1-11 odvozený od lidského laktofericinu (AM Pharma, The Netherlands; <http://www.am-pharma.com/>)).

1.1. Obecné vlastnosti antimikrobiálních peptidů

AMP jsou složkou první obranné linie organismů a nachází se prakticky ve všech formách života zahrnující bakterie, houby, rostliny, bezobratlé i obratlovce. Zachování AMP jako součásti vrozeného imunitního systému během evoluce jak eukaryotních tak prokaryotních organismů naznačuje významnost těchto látek v obraně proti mikrobiálním patogenům. V současné době je podle databáze „The antimicrobial peptide database“⁷ evidováno více než 2000 antimikrobiálních peptidů. Zatímco u většiny z nich bylo prokázáno,

že jejich prvotní biologickou funkcí je přímé usmrcení mikroorganismů, u některých se zdá, že tato aktivita je jen průvodní jev jiné hlavní biologické funkce^{8,9}.

Pro AMP je často používán název obranné peptidy hostitele (*host defense peptides*)¹⁰. U vyšších organismů tento název pak spíše vyjadřuje, že tyto peptidy mají kromě přímého antimikrobiálního účinku také imunomodulační aktivitu, kdy působí při mnohem nižších koncentracích. Obranné peptidy hostitele vyšších organismů jsou přítomny v mnoha typech buněk: na celém povrchu těla, v tkáních i v tělních tekutinách¹⁰.

Do skupiny AMP lze často zařadit degradační produkty antimikrobiálních proteinů. Antimikrobiální proteiny jsou specifickou skupinou, které taktéž vykazují antimikrobiální aktivitu. Např. u laktoferinu (glykoprotein o velikosti 80 kDa z transferinové proteinové rodiny) a jeho degradačního produktu laktofericinu byly prokázány mírné přímé antimikrobiální účinky^{11,12}. Také proteolytický štěp proteinu komplementu C3 vykazuje antimikrobiální účinky. Mnoho těchto proteolytických produktů má navíc imunomodulační vlastnosti¹⁰.

AMP obvykle obsahují 10-50 aminokyselin a podle náboje je lze rozdělit na anionické a kationické¹³. Anionické AMP se vyskytují velice zřídka a svým odlišným mechanismem mohou synergicky zvyšovat účinek kationických AMP nebo jiných antimikrobiálních faktorů. Jako příklad lze uvést lidský anionický antimikrobiální peptid dermcidin¹⁴, který je neustále exprimován v potních žlázách jako 110-ti aminokyselinový prekurzor. Poté je secernován do potu, kde je proteolyticky štěpen na kratší peptidy lišící se délkou a celkovým nábojem. Nakonec je vylučován s potem na povrch těla¹⁴.

Mnohem větší skupinou jsou kationické AMP¹⁵. Přes svou rozmanitost sdílejí některé společné vlastnosti. Jejich sekvence obsahují ve vyšší míře bazické aminokyseliny Arg a Lys, nesou tak za fyziologického pH celkově kladný náboj (+2 až +10), a vysoké procento hydrofobních aminokyselin (≥ 30 %). Často mají neuspořádanou strukturu ve vodném prostředí, ale v přítomnosti biologických membrán nebo v prostředí napodobujícím membránu vytvářejí amfipatickou konformaci obsahující hydrofobní aminokyseliny na jedné straně molekuly a hydrofilní aminokyseliny na straně druhé. Amfipatický charakter AMP je zásadní pro jejich interakce s biologickou membránou. Zatímco polární skupiny dovolují interakci s fosfolipidovými hlavičkami na povrchu membrán, hydrofobní strana může zprostředkovávat kontakt s nepolární částí fosfolipidů tvořenou řetězcem mastných kyselin¹⁶.

Schopnost většiny AMP přednostně napadat bakteriální buňku před buňkou eukaryotní je jejich významnou vlastností umožňující selektivní účinek. Důležitou roli v selektivitě hraje již zmiňovaný kladný náboj. Kladně nabitý AMP přednostně interaguje s negativně nabitou vnější

vrstvou bakteriální membrány než s vnější vrstvou eukaryotní membrány, která nese celkově neutrální náboj. Vnější vrstva membrány eukaryotních buněk je složena především ze zwitteriontových fosfolipidů jako je fosfatidylcholin a sfingomyelin a navíc obsahuje cholesterol¹⁷. Vnější vrstva bakteriální membrány obsahuje hlavně anionické fosfolipidy jako je fosfatidylglycerol a kardiolipin (CL)¹⁸.

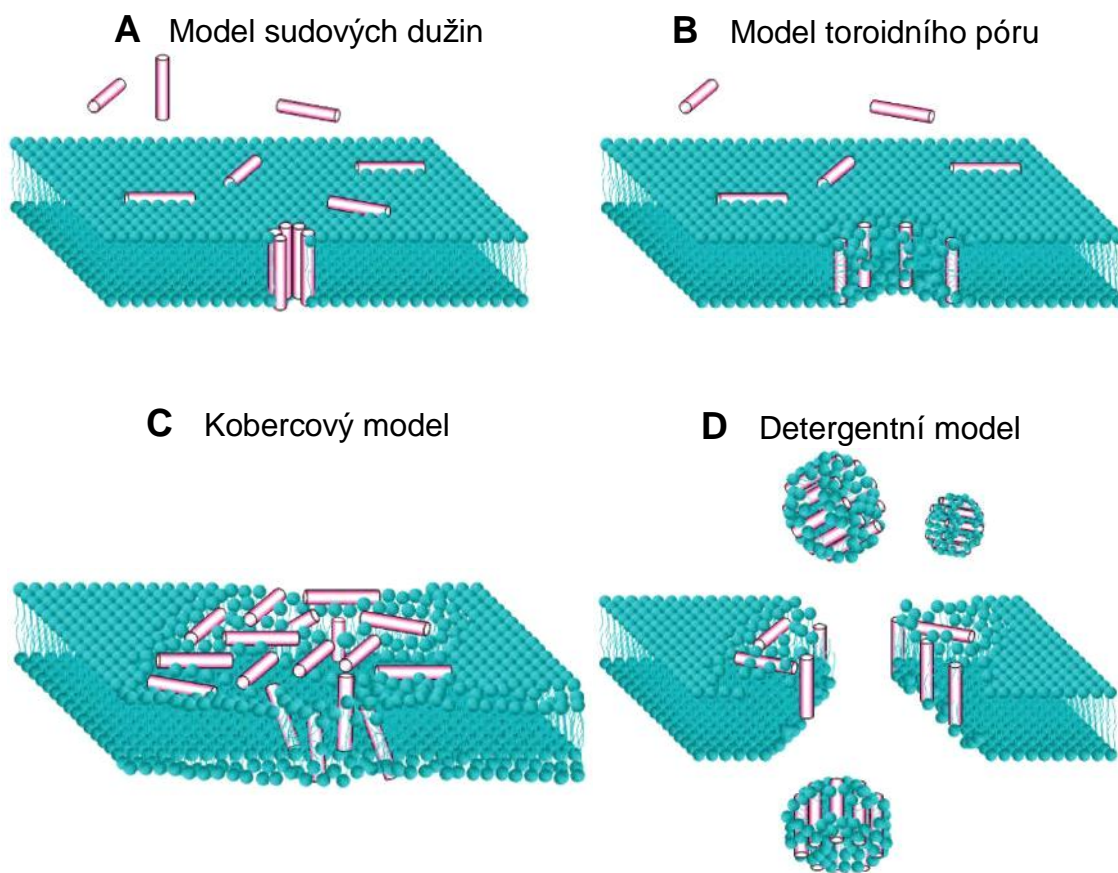
1.2. Mechanismus účinku antimikrobiálních peptidů

I přesto, že působení antimikrobiálních peptidů na bakterie je už dlouho a intenzivně zkoumáno, přesný mechanismus účinku zůstává stále nevyřešený. Předpokládá se, že na rozdíl od klasických antibiotik, většina AMP zabíjí mikroorganismy nevratným narušením jejich membrány. Zvýšení propustnosti membrány může vést k řadě dějů, které se podílejí na smrti buňky: depolarizace membrány, únik důležitých látek z buňky, translokace peptidů do cytoplasmy a ovlivnění důležitých buněčných pochodů, či může dojít k úplnému rozpadu membrány.

U kationických AMP jsou prvotní kroky mechanismu účinku společné. Nejdříve působí elektrostatická přitažlivost, kdy kladně nabitý AMP jsou přitahovány k záporně nabitému povrchu bakterií. U Gram-negativních bakterií se kladně nabitý peptidy prvně setkávají se záporným nábojem lipopolysacharidů na rozdíl od záporně nabitého povrchu Gram-pozitivních bakterií, který je tvořen především teichoovými a teichuronovými kyselinami¹⁹. Po této počáteční interakci projdou AMP přes peptidoglykanovou vrstvu, uspořádají se do amfipatické struktury a vážou se na záporně nabitou cytoplasmatickou membránu. Dále dochází ke zvýšení propustnosti membrány, ale zde se už jednotlivé cesty mechanismu účinku AMP liší, a jsou popisovány několika modely²⁰.

Dva z těchto modelů popisují účinek AMP za vzniku pórů procházejících skrz celou membránu (Obr. 1A, B). U modelu sudových dužin (*barrel stave model*)²¹ peptidy vytvářejí plášť póru tak, že se peptidy navzájem dotýkají a interagují mezi sebou. Hydrofobní strana peptidové molekuly interaguje s lipidovými řetězci mastných kyselin, zatímco hydrofilní strana vytváří vnitřek póru. U modelu toroidního póru (*toroidal model*)²² způsobují peptidy zakřivení membrány. Peptidy jsou opět vnořeny skrz celou membránu, ale oproti předchozímu modelu netvoří stěnu póru pouze peptidy, ale spolu s peptidy lemují stěnu také hlavičky membránových fosfolipidů^{23,24,25}. U dalšího navrhovaného mechanismu účinku se již póry nevytváří (Obr. 1C), ale k narušení membrány dochází tzv. kobercovým mechanismem (*carpet model*)^{26,27}. Peptidy jsou nakumulovány na povrchu membrány a leží paralelně s membránou. Po dosažení kritické koncentrace AMP dojde ke zhroucení

membrány. Toto zhroucení může vést až ke vzniku micel. Peptid zde tedy působí podobně jako detergent (*detergent model*) (Obr. 1D)²⁸. Model aktivity na rozhraní (*interfacial activity model*)²⁹ je definován jako schopnost nedokonale amfipatických peptidů narušit rozhraní mezi hydrofobními a hydrofilními částmi lipidové dvouvrstvy a tak narušit funkci membrány. Tento model objasňuje proč je dokonalá amfipaticita nežádoucí (více viz kapitola 1.5.2)²⁹. V modelu shlukování lipidů (*lipid clustering model*)³⁰ způsobují AMP segregaci anionických fosfolipidů za vzniku domén. K narušení membrány pak dochází na rozhraní domény³⁰.



Obrázek 1: Nejčastější modely pro mechanismus účinku AMP.

Narušení membrány nemusí být hlavním a jediným místem působení AMP. Po proniknutí peptidů dovnitř buňky přes narušenou membránu může být dalším cílem intracelulární složka. V cytoplasmě se AMP může vázat na bakteriální DNA nebo RNA, inhibovat ATPasovou aktivitu, potlačovat syntézu nukleových kyselin, proteinů nebo buněčné stěny¹⁶. U některých AMP byl pozorován průnik přes membránu, aniž by došlo k jejímu narušení a zdá se, že jejich způsob účinku závisí na množství peptidu. Při nízkých koncentracích peptid membránou prochází bez jejího narušení, ale až při vyšších koncentracích dochází ke zvýšení její

propustnosti¹⁶. Některé AMP jsou také schopné neutralizovat toxické produkty bakterií, jako jsou lipopolysacharidy nebo lipoteichoové kyseliny³¹.

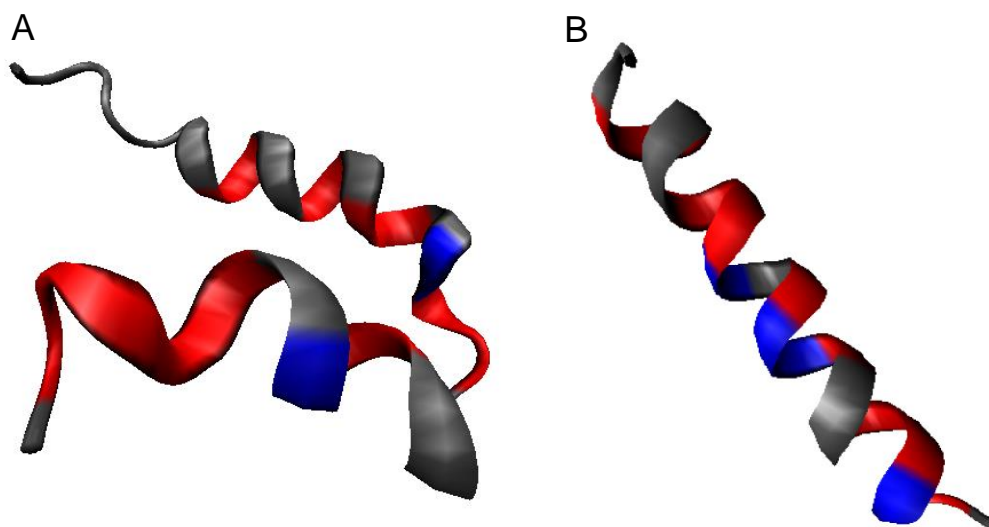
1.3. Struktura kationických antimikrobiálních peptidů

Přes rozmanitost kationických AMP existuje jen omezený počet strukturních rysů, podle kterých je lze rozdělit do tří skupin²³: (1) lineární AMP schopné vytvářet v přítomnosti membrány amfipatický α -helix, (2) cyklické AMP obsahující jednu nebo více disulfidických vazeb, (3) lineární AMP obsahující ve své sekvenci ve zvýšené míře jednu z aminokyselin (nejčastěji Pro, Gly, His nebo Trp).

1.3.1. Lineární α -helikální antimikrobiální peptidy

Jedná se o nejpočetnější a nejvíce studovanou skupinu AMP. Ve vodě se nachází nejčastěji v neuspořádaném stavu, ale v přítomnosti biologických membrán, v prostředí napodobujícím membrány nebo v organických rozpouštědlech jako je např. TFE dochází ke vzniku amfipatické α -helikální struktury. Tyto peptidy jsou spíše kratší (<40 aminokyselin), neobsahují Cys, ale některé mohou obsahovat ve své sekvenci Gly nebo Pro způsobující ohyb, který zvyšuje flexibilitu celého řetězce. Také je běžné, že N-terminální nebo C-terminální část peptidu není součástí α -helixu, ale vytváří flexibilní rozvolněnou část³².

Mezi nejvíce studované zástupce lze řadit cecropiny, cathelicidin LL-37, melittin, pardaxin či magaininy a další AMP izolované ze sekretů žabí kůže³³. Cecropin³⁴ (37 aminokyselin) z hemolymfy kukly nočního motýla martináče *Hyalophora cecropia*, melittin^{35,36} (26 aminokyselin) z jedu včely medonosné (*Apis mellifera*) a pardaxin³⁷ (33 aminokyselin) z platýse *Pardachirus marmoratus* (Obr. 2A) vytvářejí α -helikální konformaci přerušenu flexibilním ohybem^{38,39}. Naopak např. magainin-2⁴⁰, který obsahuje 23 aminokyselin a byl izolovaný z kůže žáby *Xenopus laevis*, vytváří nepřerušovaný α -helix (Obr. 2B)⁴¹. Také v lidském těle lze najít zástupce z této skupiny AMP, např. LL-37, který se řadí do rodiny cathelicidinů⁴². LL-37 obsahuje 37 aminokyselin a byl izolovaný z myelocytů, metamyelocytů a neutrofilů a dále byl nalezen v epiteliálních buňkách varlat, kůže, gastrointestinálního a respiračního traktu⁴³.



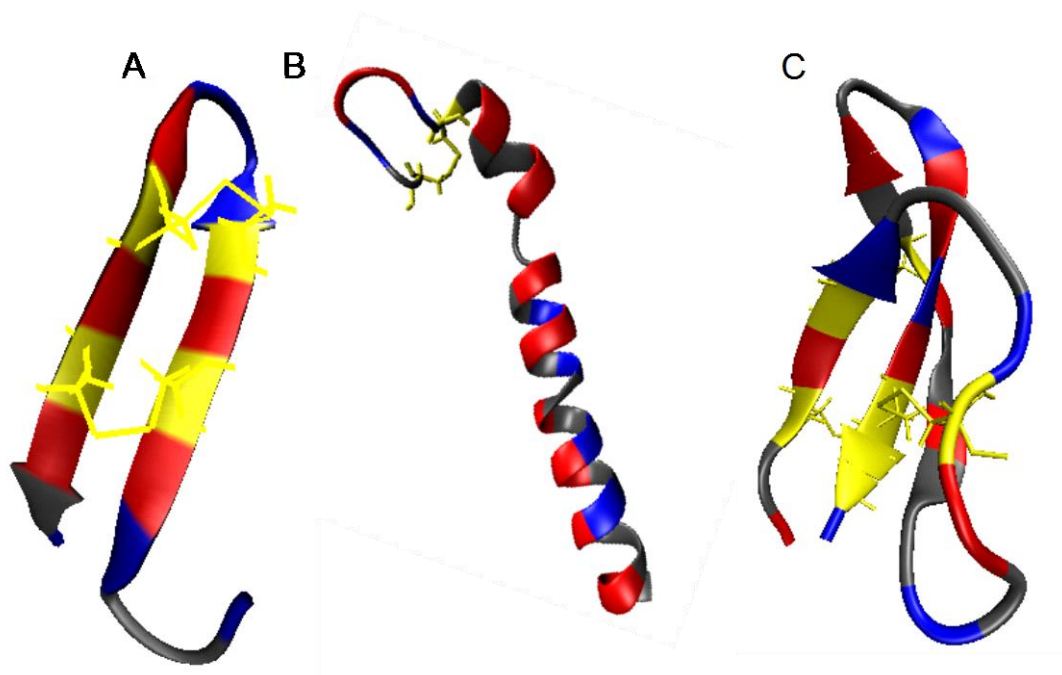
Obrázek 2: Struktury zástupců ze skupiny lineárních α -helikálních AMP. Struktura pardaxinu (PDB ID: 2KNS) z platýse v přítomnosti LPS micel (A) a struktura magaininu-2 (PDB ID: 2LSA) v přítomnosti fosfatidylcholinových micel (B). Hydrofobní aminokyseliny jsou znázorněné **červeně**, bazické (Arg, Lys) **modře**, ostatní aminokyseliny šedě.

1.3.2. Cyklické antimikrobiální peptidy

Do druhé skupiny AMP patří peptidy obsahující dva a více Cys spojených do disulfidických můstků⁴⁴. Cyklické AMP s 1 nebo 2 disulfidickými můstky většinou vytvářejí strukturu β -vlásenky (β -hairpin), která je tvořena antiparalelním β -listem stabilizovaná disulfidickými můstky⁴⁵. Patří mezi ně např. tachyplesiny, které byly nalezeny v leukocytech krabů ostrorepů a protegriny (Obr. 3A), které byly izolovány z prasečích leukocytů⁴⁶. Některé cyklické AMP s 1 nebo 2 disulfidickými můstky ovšem mohou obsahovat α -helikální strukturu. Mezi jejich zástupce patří např. brevininy⁴⁷ a gaeguriny⁴⁸ (Obr. 3B), které byly izolovány z kůže žab z čeledi skokanovitých (Ranidae). V těchto peptidech se s pomocí disulfidického můstku vytváří 6-ti členný až 11-ti členný kruh nazývaný často jako „Rana box“⁴⁹.

Většina cyklických peptidů s větším počtem disulfidických můstků se řadí mezi defensiny, které jsou významnou skupinou AMP^{50,51}. Defensiny jsou evolučně konzervované v rostlinách, houbách, hmyzu, měkkýších a obratlovcích. Všechny defensiny obsahují 6-8 Cys. Podle pozice Cys a jejich spojení je lze rozdělit do 5 skupin: rostlinné defensiny, defensiny bezobratlých a α -, β -, θ -defensiny. Defensiny α - a β - se nacházejí výhradně

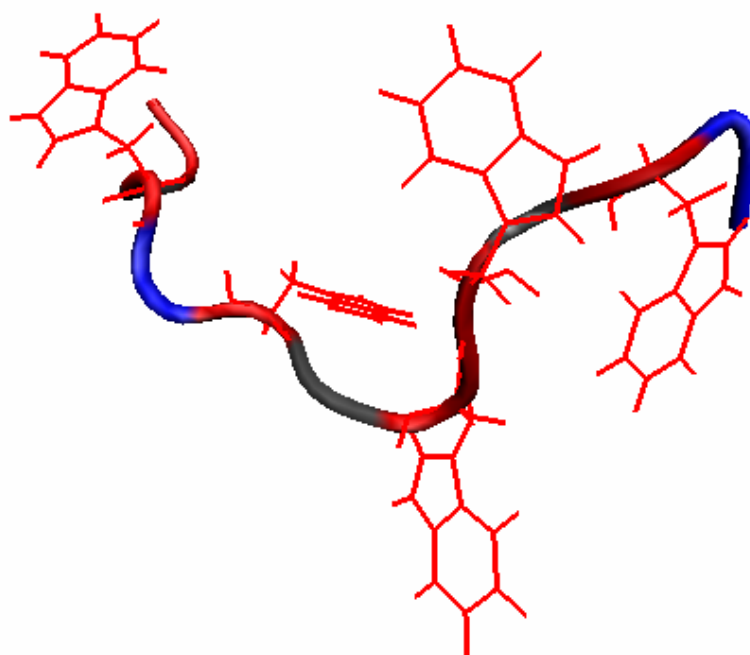
v obratlovcích, θ -defensiny byly nalezeny jen v primátech²³. Většina defensinů objevených v obratlovcích vytváří β -skládaný list se třemi řetězci (Obr. 3C). Defensiny izolované z bezobratlých živočichů, rostlin a některé savčí defensiny obsahují směs β - a α -struktur⁵².



Obrázek 3: Struktury zástupců cyklických AMP. Struktura protegrinu 1 (PDB ID: 1PG1) z prasečích leukocytů v přítomnosti LPS micel (A), gaegurinu-4 (PDB ID: 2G9L) ze sekretu kůže žáby *Rana rugosa* ve vodě (B) a lidského α -defensinu 5 (PDB ID: 2LXZ) ve vodě (C). Hydrofobní aminokyseliny jsou znázorněny červeně, bazické (Arg, Lys) modře, cysteiny a disulfidické můstky žlutě, ostatní aminokyseliny šedě.

1.3.3. Antimikrobiální peptidy s výrazným zastoupením jedné aminokyseliny

Sekvence peptidů z této nejméně početné skupiny kationických AMP je bohatá na některou aminokyselinu, nejčastěji se jedná o Trp, Arg, Pro, Gly nebo His. Nejstudovanějším peptidem této skupiny je indolicidin izolovaný z cytoplasmatických granulí hovězích neutrofilů⁵³, který obsahuje z celkových 13-ti aminokyselin pět Trp a tři Pro. Indolicidin nevytváří sekundární strukturu s amfipatickým charakterem, ale má protáhlou strukturu, která má v přítomnosti micel tvar klínu (Obr. 4) s hydrofobními Trp umístěnými na špičce klínu a pozitivně nabitými aminokyselinami po jeho stranách^{54,55,56}. Mezi další zástupce patří prasečí tritrypticin bohatý na Trp a Arg, prasečí PR-39 bohatý na Pro a Arg a lidský histatin s velkým podílem His¹⁶.



Obrázek 4: Struktura indolicidinu se znázorněnými Trp stanovená NMR v přítomnosti membrán z fosfatidylcholinu (PDB ID: 1G89). Hydrofobní aminokyseliny jsou znázorněné **červeně**, bazické (Arg, Lys) **modře**, zbylé aminokyseliny šedě.

1.4. Antimikrobiální peptidy izolované z hmyzu

1.4.1. Imunitní systém hmyzu

Hmyz během svého vývoje kolonizoval kromě moře všechny možné ekologické systémy a tvoří 90 % druhů veškeré živočišné říše. Pro tak úspěšný vývoj si musel vytvořit komplexní a efektivní vrozený (nespecifický) imunitní systém. Na rozdíl od obratlovců nedisponuje adaptivním (specifickým) imunitním systémem. Imunitní systém hmyzu netvoří žádné paměťové buňky, jejich obranný mechanismus je ale rychlý, jeho účinky přetrvávají několik dní a představuje velice účinnou ochranu proti mikrobiální infekci⁵⁷.

Imunitní systém hmyzu můžeme rozdělit na vnější bariéry a složku buněčnou a humorální. Vnější mechanická bariéra je tvořena kutikulou. Buněčná reakce je zprostředkována hemocyty, které se účastní fagocytózy, nodulace a enkapsulace mikroorganismů a apoptotických buněk. Výsledkem humorální odpovědi je spuštění rychlé syntézy antimikrobiálních faktorů (lysozymu a AMP) a dvou proteolytických kaskád:

koagulační kaskády a fenoloxidasové kaskády, která vede k melanizaci a celý tento proces přispívá k imunitní odpovědi^{58,59}.

Důležitou součástí úspěšné imunitní odezvy hmyzu jsou právě AMP. Hmyz je rychle vytváří biosyntézou v reakci na infekci především v tukovém tělese (tkáň, která odpovídá savcím játrům). Poté jsou vyloučeny do hemolymfy, která je už snadno rozvede do celého organismu. AMP mohou být vytvářeny také v hemocytech, epiteliálních buňkách kutikuly, ve střevě, slinných žlázách a rozmnožovacím traktu⁶⁰. U bodavého hmyzu jsou navíc obsaženy v jeho jedovém vaku. AMP nalezené v hemolymfě jsou mnohem různorodější a odlišné od AMP nalezených v jedu bodavého hmyzu. Obsah peptidů v hemolymfě dosahuje mikromolárních koncentrací, zatímco v jedových vácích koncentrace peptidů dosahuje i milimolárních hodnot^{61,62}.

1.4.2. Antimikrobiální peptidy z hemolymfy hmyzu

V hemolymfě hmyzu (Tabulka 1) se vyskytují zástupci všech tří skupin kationických AMP⁶³: (1) lineární α -helikální AMP, kde nejvýznamnější část představují cecropiny, (2) cyklické AMP, jejíž součástí jsou především defensiny a (3) AMP s výrazným zastoupením Pro nebo AMP bohaté na Gly.

1.4.2.1. Lineární α -helikální antimikrobiální peptidy z hemolymfy hmyzu

Nejvýraznější zástupci této skupiny jsou cecropiny (Tabulka 1). Právě cecropiny, izolované z hemolymfy motýla martináče *Hyalophora cecropia*, se považují za vůbec první objevené AMP^{34,64}. Cecropiny jsou lineární peptidy o délce 35-39 aminokyselin zaujímající v hydrofobním prostředí stabilní α -helikální konformaci. Od savčích cecropinů se hmyzí cecropiny liší amidovaným C-koncem a rozdělením α -šroubovice flexibilním úsekem na dvě části. Cecropiny mají antimikrobiální účinek proti široké škále bakterií a mají malou toxicitu proti eukaryotním buňkám^{65,66,67}.

Strukturu α -šroubovice vytvářejí také moriciny⁶⁸ (Tabulka 1). Tato skupina AMP se nachází výhradně v motýlech (Lepidoptera) a obsahuje 42 aminokyselin. Na rozdíl od cecropinů vytvářejí dlouhý zahnutý, ale nepřerušovaný α -helix (5.-36. aminokyselina). Moriciny byly izolované např. z bource morušového (*Bombyx mori*)⁶⁸ nebo můry *Spodoptera litura*⁶⁹. Vykazují aktivitu proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím⁷⁰.

Tabulka 1: Přehled sekvencí vybraných zástupců AMP izolovaných z hemolymfy hmyzu.

Organismus	Název AMP	Primární struktura
α-helikální peptidy		
<i>H. cecropia</i>	Cecropin A	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK-NH ₂
<i>B. mori</i>	Moricin	AKIPIKAIKTVGKAVGKGLRAINIASTANDVFNFLKPKKRKA
Cyklické AMP		
<i>P. terranova</i>	Defensin A	ATCDLLSGTGINHSACAAHCLLRGNRGGYCNKGKVCVCRN
<i>L. sericata</i>	Lucifensin	ATCDLLSGTGVKHSACAAHCLLRGNRGGYCNGRAICVCRN
<i>A. mellifera</i>	Royalisin	VTCDLLSFKGQVNDSCAANCLSLGKAGGHCEKVGCI C RKTSFKD LWDKRF-NH ₂
<i>D. melanogaster</i>	Drosomycin	DCLSGRYKGPCAVWDNETCRRVCKEEGRSSGHCSPSLKCWCEG
<i>H. virescens</i>	Heliomicin	DKLIGSCVWGAVNYTSDCNGECKRRGYKGGHCGSFANVNCWCE
<i>P. spiniger</i>	Termicin	ACNFQSCWATCQAQHSIYFRRAFCDRSQCKCVFVRG-NH ₂
<i>P. maculiventris</i>	Thanatin	GSKKPVIICYNRRRTGKCQRM
AMP bohaté na Pro		
<i>D. melanogaster</i>	Drosocin	GKPRPYSPRPISHPRPIRV
<i>A. mellifera</i>	Apidaecin IA	GNNRPVYIPQPRPPHPRI
<i>M. gulosa</i>	Formaecin 1	GRPNPVNNKPTPHRL
<i>D. elanogaster</i>	Metchnikowin	HRHQGP I FDTRPSPFNPNQPRPGPIY
<i>B. pascuorum</i>	Abaecin	FV P YNPPRPGQSKPFPSFGHGFNPKIQW P YPLPNPGH
<i>T. ni</i>	Lebocin	SLPSLRLPGRNFP I PIPTPPFVPKPRRFPIYV
AMP bohaté na Gly		
<i>H. cecropia</i>	Attacin	DAHGALT L NSDGTSGAVVKVPFAGNDKNIVSAIGSV D LTD R QKLG AATAGVALDNINGHGLSLTDTHIPGFGDKMTAAGKVN V FHNDNHDI TAKAFATRNMPDIANVPNFNTVGGGIDYMFKDKIGASASAAHTDFI NRNDYSLDGKLNLFKTPDTSIDFNAGFKKFDTPFMKSSWE P NFGF SLSKYF

O-glykosylovaný Thr a Ser je znázorněný podržením.

1.4.2.2. Cyklické antimikrobiální peptidy z hemolymfy hmyzu

Nejrozsáhlejší skupinou v hmyzí říši představují defensiny (Tabulka 1). První hmyzí defensiny byly izolovány z řádu dvoukřídlých (Diptera), a to z larev much druhů *Sarcophaga perigrina*⁷¹ a *Phormia terranova*⁷² (Obr. 5A). Délka řetězce defensinů nejčastěji dosahuje 34-46 aminokyselin. Byly ale nalezeny jak kratší, tak i delší varianty jako např. 51 aminokyselin obsahující defensin ze včely medonosné (*Apis mellifera*)⁷³ a čmeláka rolního (*Bombus pascuorum*)⁷⁴.

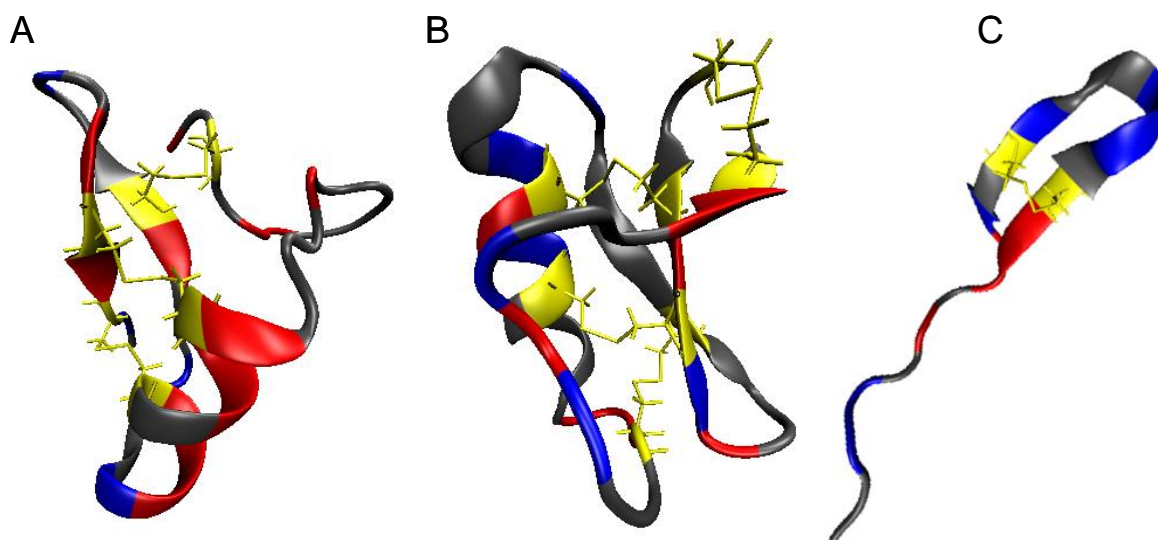
Peptidové sekvence jsou velmi podobné v rámci jednoho hmyzího řádu, ale značně se liší mezi jednotlivými řády hmyzu. Od savčích defensinů se liší v propojení disulfidických můstků, které je u hmyzích defensinů v pořadí 1-4, 2-5 a 3-6, a hlavně v prostorové struktuře.

Hmyzí defensiny obsahují ve své molekule na rozdíl od savčích defensinů vedle antiparalelního β -listu též dominantní α -helix. Hmyzí defensiny jsou aktivní převážně proti Gram-pozitivním bakteriím a některé proti plísním⁷⁵.

Defensiny s aktivitou proti bakteriím byly izolovány např. z mouchy *S. peregrina*⁷¹ a *P. terranova*⁷² (Obr. 5A) a také z larev much bzučivek (*Lucilia sericata* a *Lucilia cuprina*), u kterých byly tyto defensiny pojmenované jako lucifensiny^{76,78}. Larvy bzučivek se využívají k léčbě špatně se hojících ran obsahující infikovanou a mrtvou tkáň a právě lucifensin se považuje za klíčovou složku úspěchu larvální terapie^{76,77,78}. Tyto defensiny obsahují 3 disulfidické můstky, kdy první disulfidický můstek spojuje N-terminální smyčku s jedním vláknem β -skládaného listu a zbývající dva spojují α -helix s druhým vláknem (CS $\alpha\beta$ motiv)⁵².

Výhradně protiplísňovou aktivitu má drosomycin⁷⁹ z octomilky *Drosophila melanogaster*, heliomicin⁸⁰ a gallerimycin⁸¹ z larev motýlů *Heliothis virescens* a *Galleria mellonell* (řád motýli (Lepidoptera)). Drosomycin obsahuje 44 aminokyselin a od ostatních hmyzích defensinů se liší přítomností čtvrtého disulfidického můstku a jiným pořadím disulfidických můstků. Drosomycin (Obr. 5B) je velice strukturně podobný defensinům z rostlin a oproti ostatním hmyzím defensinům má navíc N-terminální β -řetězec, který je spojen disulfidickým můstkem s C-koncovým cysteinem⁸². Silnou protiplísňovou aktivitu má také termicin⁸³ z termita *Pseudacanthotermes spiniger* (řád termiti (Isoptera)), ale vykazuje i slabou aktivitu proti bakteriím.

Thanatin⁸⁴ je příkladem cyklického AMP s jedním disulfidickým můstkem (Obr. 5C). Byl izolován z brouka *Podisus maculiventris* řádu polokřídлых (Hemiptera). Sekvence thanatinu nemá podobnost s hmyzími defensiny, ale dosahuje až 50 % podobnosti z breviny izolovaných ze sekretu kůže žab. Thanatin ve vodě vytváří od 8. aminokyseliny β -vlásečku stabilizovanou disulfidickým můstkem. Zatímco N-terminální část je strukturně rozmanitá, na C-konci vzniká dobře definovaná smyčka nesoucí pozitivní náboj díky bazickým aminokyselinám, které jsou soustředěny mezi oběma cysteiny (nazývaná „Insect box“ jako analogie k „Rana boxu“). Thanatin má široké spektrum účinku jak proti Gram-pozitivním, tak i Gram-negativním bakteriím a některým plísním. Je zajímavé, že enantiomer (peptid složený pouze z D-aminokyselin) thanatinu měl stejný účinek proti plísním jako přírodní peptid, ale byl téměř neaktivní proti bakteriím. To naznačuje, že thanatin, kromě membranolýtické aktivity, vykazuje další mechanismus účinku⁸⁵.



Obrázek 5: Struktury defensinu A (PDB ID: 1ICA) z mouchy *Phormia terranova* (A), drosomicinu (PDB ID: 1MYN) z octomilky *Drosophila melanogaster* (B) a thanatinu z brouka *Podisus maculiventris* (PDB ID: 8TFV) (C). Hydrofobní aminokyseliny jsou znázorněné červeně, bazické (Arg, Lys) modře, cysteiny a disulfidické můstky žlutě, ostatní aminokyseliny šedě.

1.4.2.3. Antimikrobiální peptidy bohaté na prolin z hemolymfy hmyzu

Sekvenci AMP z této skupiny (Tabulka 1) charakterizuje přítomnost více než 25 % Pro, který se vyskytuje ve dvojicích či ve trojicích společně s aminokyselinami Arg nebo His (ArgPro, ProArgPro nebo ProHisPro)⁸⁶. Tyto AMP obsahují 14-39 aminokyselin a podle délky se dělí na kratší (méně než 20 aminokyselin) a delší (více než 20 aminokyselin)⁸⁷.

Mezi kratší patří drosocin⁸⁸ z octomilky *Drosophila melanogaster*, formaeciny⁸⁹ z mravenců, apidaeciny⁷⁴ ze včel, vos a čmeláků nebo pyrrhocorin⁹⁰ a metalnikowin⁹¹ z ploštic. Většina kratších peptidů této skupiny vykazuje vysokou selektivitu pro Gram-negativní bakterie, zatímco Gram-pozitivní bakterie k nim nejsou citlivé.

Delší sekvenci obsahuje metchnikowin⁹² z octomilky *D. melanogaster*, lebociny⁹³ a abaeciny⁹⁴ nalezené ve více druzích blanokřídlého hmyzu. Abaeciny a lebociny jsou aktivní proti oběma skupinám bakterií, zatímco metchnikowiny jsou výhradně účinné proti plísním. Některé z těchto peptidů mají glykosylované aminokyseliny Thr nebo Ser, které jsou umístěné ve střední části sekvence. Biologická role navázaného cukru není známá, nicméně peptidy si svoji aktivitu ponechávají i bez cukerné jednotky^{92,94}.

Strukturní studie apidaecinu a drosocinu naznačují⁸⁶, že tyto peptidy bohaté na prolin mají tendenci vytvářet konformaci typu polyprolin II - protáhlou strukturu tvořenou levotočivými helikálními úseky. Přítomnost membrán nebo látek napodobujících membrány významně nemění tvar molekuly tak jako u jiných AMP. Strukturně-aktivními studiemi se zjistilo, že enantiomery apidaecinu, drosocinu a pyrrhocoricinu byly neaktivní. Jejich baktericidní mechanismus účinku spočívá v interakci se stereospecifickým prvkem a nikoliv v narušení struktury bakteriální membrány, jako je tomu u většiny AMP⁸⁶.

1.4.2.4. Antimikrobiální peptidy bohaté na glycin z hemolymfy hmyzu

AMP bohaté na Gly (Tabulka 1) dosahují větších molekulových hmotností (9-30 kDa). Jejich společnými znaky jsou abnormální zastoupení glycinů (10-22 %) a převažující aktivita proti Gram-negativním bakteriím⁶³. Jedny z prvních objevených AMP obsahujících glycin v tak vysoké míře byly attaciny⁹⁵ izolované z martináče *H. cecropia* a jim podobné sarcotoxiny II⁹⁶ z masařky *Sargophaga pelegina*. Attaciny a sarcotoxiny, peptidy o molekulové hmotnosti 20-28 kDa, byly izolované z dalších druhů hmyzu z řádů motýlů (Lepidoptera) a dvoukřídlých (Diptera).

Podobnost s attaciny a sarcotoxiny II má i C-koncová část peptidu diptericinu⁹⁷ a hymenoptaecinu⁹⁸. Diptericin objevený v larvách mouchy *Phormia terranova* (9 kDa) ovšem také sdílí podobnou sekvenci bohatou na prolin s drosocinem a pyrrhocoricinem a stejně jako tyto peptidy je glykosylován⁹⁹. Hymenoptaecin byl izolovaný z hemolymfy včely medonosné a je složený z 93 aminokyselin⁹⁸.

Žádnou sekvenční podobnost naopak nesdílí coleopteracin a gloveriny. Coleopteracin¹⁰⁰ je silně bazický peptid, který obsahuje 74 aminokyselin a byl izolovaný z brouka potměníka brazilského (*Zophobas atratus*). Gloveriny¹⁰¹, antimikrobiální proteiny z hemolymfy martináče *Hyalophora gloveri* a můry *Helicoverpa armigera*, se s attaciny shodují svým účinkem proti Gram-negativním bakteriím. Také jsou schopné interagovat s lipopolysacharidy a inhibovat syntézu vnější membrány vedoucí k zvýšení její propustnosti. Struktura gloverinů je ve vodě neuspořádaná, ale v hydrofobním prostředí dochází ke změně a peptid zaujímá konformaci obsahující až 50 % α -helixu¹⁰¹.

1.4.3. Antimikrobiální peptidy z jedu blanokřídlého hmyzu

1.4.3.1. Jedové váčky blanokřídlého hmyzu

Společným znakem hmyzu ze skupiny žahadloví blanokřídlí (Hymenoptera: Apocryta: Aculeata) je žihadlo (přeměněné kladélko), které je spojené s jedovým váčkem jedové žlázy a je schované uvnitř zadečku. Mezi nejznámější zástupce patří vosy, včely, čmeláci a mravenci. Obsah látek v jedu se mezi jednotlivými druhy liší a odvíjí se podle funkce, kterou má jed vykonávat. Parazitické druhy využívají jed pro paralýzu oběti¹⁰². Jed u sociálních včel a vos se vyvinul do funkce obranné proti predátorům a konkurentům¹⁰². U mravenců bylo již ukázáno, že jed z jedových váčků využívají jak na ochranu, tak na útok¹⁰².

Látky obsažené v jedu lze podle molekulové hmotnosti rozdělit do 3 skupin. Do první skupiny se řadí proteiny a to především hojně se vyskytující enzymy hyaluronidasa a fosfolipasa A2 nebo B. Druhá složka látek je reprezentována peptidy o molekulové hmotnosti maximálně 10 kDa řadí se mezi neurotoxiny nebo cytolytické látky mezi které patří AMP. Třetí skupina sestává z nízkomolekulárních látek jako jsou ionty, volné aminokyseliny, biogenní aminy, neurotransmitery a alkaloidy. Evoluční tlak optimalizoval obsah látek v jedu tak, aby jejich nízká koncentrace působila rychle a efektivně. Nedochází tak ke zbytečné ztrátě energie na biosyntézu jednotlivých komponent. Ač role AMP v jedu nebyla zatím zcela jednoznačně vysvětlena, je zde několik předpokladů pro jejich funkci. Za prvé může AMP ochraňovat jedince před infekcí, která by se mohla přenést z napadnuté oběti⁶¹. Dále je u společenského hmyzu riziko zanesení patogenů do hnízda a AMP z jedu může napomáhat k desinfekci prostředí a vajíček¹⁰³. AMP by také mohly sloužit jako konzervační činidlo v případě, kdy paralyzovaná oběť slouží jako výživa po delší dobu. U některých AMP je pak možné, že kromě antimikrobiální funkce vykazují ještě jinou aktivitu a mohou synergicky působit s dalšími komponenty jedu¹⁰².

1.4.3.2. Antimikrobiální peptid z jedu včely medonosné

Hlavní peptidová složka jedu včely medonosné (*Apis mellifera*) je melittin^{35,36}, který tvoří 40-50 % suché váhy včelího jedu. Melittin se skládá z 26 aminokyselin (Tabulka 2) a jeho C-konec je amidován. V nízkých koncentracích se vyskytuje v monomerní formě a ve vodě vytváří rozvolněnou strukturu. Za vhodných podmínek je schopný vytvářet α -helikální strukturu, agregovat a vytvářet tetramer. Tetramer vzniká při vysoké koncentraci solí (např. 2 M NaCl), vysoké koncentraci melittinu (>4 mM) a vysokém pH. Vznik α -helixu, ve kterém

Pro na pozici 14 vytváří ohyb, je podpořen přítomností membrán nebo některých organických činidel^{38,104,105}.

Melittin je neselektivní AMP a vykazuje jak aktivitu proti bakteriím, tak toxicitu proti eukaryotním buňkám. Jeho značná hemolytická aktivita se projevuje při stejných koncentracích peptidů jako antimikrobiální aktivita¹⁰⁶. Byl prokázán účinek melittinu proti rakovinným buňkám¹⁰⁷, HIV infekci¹⁰⁸ a proti jednobuněčným parazitům jako jsou trypanosomy nebo leishmanie^{109,110}. Melittin způsobuje uvolnění histaminu z žírných buněk, interaguje s proteiny, jako jsou G-proteiny, kalmodulin, kalsekvestrin, lehkými řetězci myosinu a inhibuje ATPasy P-typu (Ca^{2+} -ATPasa, H^+K^+ -ATPasa, Na^+K^+ -ATPasa)^{105,111}. Dále zvyšuje aktivitu enzymů proteinkinasy C, Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní kinasy II a fosfolipasy A_2 ^{112,113,114}.

Tabulka 2: Přehled sekvencí vybraných zástupců AMP izolovaných z jedu včel, vos, sršňů a čmeláků

Organismus	Název AMP	Primární struktura
<i>A. mellifera</i>	melittin	G I G A V L K V L T T G L P A L I S W I K R K R Q Q-NH ₂
<i>M. pennsylvanicus</i>	bombolitin-1	I K I T T M L A K L G K V L A H V-NH ₂
<i>V. lewisii</i>	mastoparan	I N L K A L A A L A K K I L-NH ₂
<i>V. crabro</i>	crabrolin	F L P L I L R K I V T A L-NH ₂
<i>P. exigua</i>	protopolybia-MP-I	I N W L K L G K K V S A I L-NH ₂
<i>P. exigua</i>	protopolybia-MP-II	I N W K A I I E A A K Q A L-NH ₂
<i>P. exigua</i>	protopolybia-MP-III	I N W L K L G K A V I D A L-NH ₂
<i>P. dorsalis dorsalis</i>	PDD-A	I N W K K I F E K V K N L V-NH ₂
<i>P. dorsalis dorsalis</i>	PDD-B	I N W L K L G K K I L G A L-NH ₂
<i>A. flavomarginatum micado</i>	EMP-AF	I N L L K I A K G I I K S L-NH ₂
<i>E. rubronotatus</i>	eumenitin	L N L K G I F K K V A S L L T
<i>A. samariensis</i>	anoplin	G L L K R I K T L L-NH ₂
<i>O. decoratus</i>	decoralin	S L L S L I R K L I T
<i>M. alfibrans</i>	melectin	G F L S I L K K V L P K V M A H M K-NH ₂
<i>O. rufa</i>	osmin	G F L S A L K K Y L P I V L H V-NH ₂
<i>L. laticeps</i>	LL-I	V N W K K V L G K I I K V A K-NH ₂
<i>L. laticeps</i>	LL-II	V N W K K I L G K I I K V A K-NH ₂
<i>L. laticeps</i>	LL-III	V N W K K I L G K I I K V V K-NH ₂

1.4.3.3. Antimikrobiální peptidy z jedu vos, sršňů a čmeláků

Jed čmeláků obsahuje AMP bombolitiny (Tabulka 2). Prvních pět bombolitinů bylo objeveno v jedu čmeláka *Megabombus pennsylvanicus*¹¹⁵ a další pak byly izolovány v jedu čmeláků *Bombus lapidarius*¹¹⁶ a *Bombus ignitus*¹¹⁷. Tyto peptidy obsahují 17-19 aminokyselin a sdílejí velice podobnou sekvenci.

Podstatnou složkou jedu sociálních vos a sršňů jsou navzájem podobné AMP mastoparany (Tabulka 2) složené ze 14 aminokyselin, amidované na C-konci a nesoucí pozitivní náboj od 3 do 5¹¹⁸. První mastoparan byl objeven z jedu sociální vosy *Vespula Lewisii*¹¹⁹. V jedu sršně *Vespa crabro* byl vedle mastoparanu objeven také crabrolin¹²⁰, který se skládá pouze z 13 aminokyselin a obsahuje Pro na pozici 3.

Crabrolin, bombolitiny a mastoparany se od sebe navzájem liší v sekvenci, ale přesto vykazují velice podobné biologické vlastnosti, např. napomáhání funkci fosfolipasy A₂, degranulace žírných buněk a uvolnění histaminu, inhibice proteinkinasy C a ATPas, stimulace G-proteinů^{61,119,121}. Všechny výše zmíněné peptidy obsahují amidovanou C-koncovou aminokyselinu a vytvářejí v přítomnosti TFE, SDS micel nebo membrán α -helikální strukturu. U mastoparanů se na rozdíl od melittinu nevyskytuje v jejich sekvenci Pro a jejich struktura v tomto prostředí obsahuje 70-85 % α -helixu, přičemž krátká N-koncová sekvence je v neuspořádané struktuře^{122,123}.

Podle očekávání také jedy dalších sociálních vos obsahují více či méně podobné peptidy s mastoparany (Tabulka 2). Je ovšem zajímavé, že např. peptidy ze skupiny mastoparanů izolované ze sociálních vos z podčeledi vosíkovití (*Polistinae*) se neshodují v biologických aktivitách s výše zmíněnými mastoparany^{124,125,126}. V jedu sociální vosy *Protopolybia exigua* byly objeveny tři AMP, které lze rozdělit podle biologických aktivit do dvou skupin. Protopolybia-MP I je hemolytický peptid a způsobuje degranulaci žírných buněk narušením membrány. Protopolybia-MP II a Protopolybia-MP III nejsou hemolytické, ale zachovávají si schopnost degranulovat žírné buňky¹²⁷. Tento proces ale nejspíše probíhá přes vazbu na G-proteinové receptory. Také v jedu vosy *Polistes dorsalis dorsalis* byly nalezeny dva AMP (PDD-A, PDD-B) s podobnou sekvencí, ale lišící se v hemolytické aktivitě¹²⁶.

Peptidy s podobnými jak strukturními tak biologickými vlastnostmi jako mastoparany byly objeveny také v jedu solitérních vos. Např. v jedu vosy *Anterhynchium flavomarginatum micado* byl objeven eumenine mastoparan-AF (EMP-AF)¹²⁸. Dále byl z jedu solitérní vosy *Eumenes rubronotatus* izolován eumenitin, homolog EMP-AF. Ten na rozdíl od mastoparanů navíc obsahuje na C-konci polární aminokyselinu Thr, který není amidovaný. Eumenitin vykazuje nízkou aktivitu proti bakteriím, není hemolytický a jeho schopnost degranulovat

žirné buňky je oproti mastoparanům nižší¹²⁹. Zatím nejkratším objeveným přírodním antimikrobiálním peptidem je anoplin¹³⁰ objevený v jedu soliterní vosy hrabalky *Anoplius samariensis*. Anoplin obsahuje 10 aminokyselin, je aktivní proti bakteriím, degranuluje žirné buňky a není hemolytický. AMP decoralin¹³¹ (11 aminokyselin) izolovaný z jedu vosy jízlivky *Oreumenes decoratus* není podobně jako eumenitin na C-konci amidovaný. Je méně účinný než anoplin proti bakteriím, není hemolytický a vykazuje i nižší degranulační aktivitu žirných buněk. Navíc byl u něho prokázán účinek proti leishmaniím.

1.4.3.4. Antimikrobiální peptidy z jedu volně žijících včel

Jak je vidět z předchozího textu, je známo mnoho AMP z jedových váčků vos z podřádu štíhlipasí (Apocrita) z čeledi sršňovití (Vespoidea: Vespidae) a velkému zájmu se těší také AMP ze včel z čeledi včelovití (Apoidea: Apidae), kam se řadí včela medonosná a čmeláci. AMP ze včel jiných čeledí jsou prozkoumány daleko méně (Tabulka 2). První objevený AMP z jedu volně žijící včely byl melectin z kleptoparazitické včely smutilky obecné (*Melecta albifrons*, čeleď včelovití (Apidae))¹³². Pak následoval osmin ze soliterní včely zednice rezavé (*Osmia rufa*, čeleď čalounicovití (Megachilidae))¹³³ a tři lasioglossiny (LL-I, LL-II, LL-III) z volně žijící eusociální včely ploskočelky velkohlavé (*Lasioglossum laticeps*, čeleď ploskočelkovití (Halictidae))¹³⁴. Všechny tyto AMP mají vysokou antimikrobiální aktivitu proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím i proti plísním a vykazují pouze nízkou hemolytickou aktivitu.

U lasioglossinů byla navíc zkoumána schopnost degranulovat žirné buňky, která je ve srovnání s mastoparanem nízká. Další studie ukázaly, že LL-III je schopný zabránit vzniku bakteriálního biofilmu. LL-III si svoji aktivitu zachovával i po kovalentním navázání přes „PEG raménko“ na silikonový povrch a tak se tento peptid zdá být vhodným kandidátem pro antimikrobiální úpravu povrchů tělních implantátů a různých kloubních náhrad náchylných k tvorbě biofilmu¹³⁵.

Melectin, lasioglossiny i osmin jsou na C-konci amidované a v prostředí TFE, SDS micel nebo vezikul vytvářejí α -helikální struktury. Lasioglossiny nemají v sekvenci Pro a vytvářejí ucelenou šroubovici především na N-terminální části peptidu^{134,136}. Gly uprostřed sekvence způsobuje zakřivení do mírného oblouku¹³⁴. Melectin obsahuje v centrální části peptidu Pro, který způsobuje ohyb α -helikálního řetězce. Jak Gly v lasioglossinu, tak Pro v melectinu hrají významnou roli pro selektivitu účinku mezi prokaryotními a eukaryotními buňkami (viz více kapitola 1.5.1)¹³².

1.4.3.5. Antimikrobiální peptidy z jedu mravenců

Mravencovití tvoří významnou čeleď blanokřídlého hmyzu v podřádu žahadlovitých a řadí se do stejné nadčeledi jako vosy (Vespoidea: Formicidae). Přes velkou rozmanitost mravenců byly AMP (Tabulka 3) objeveny jen u pár druhů. Tyto druhy ovšem disponují větším počtem AMP odlišujícími se biologickými aktivitami.

Z jedu mravence *Pachycondyla goeldii* bylo izolováno 15 peptidů označených jako ponericiny¹³⁷ a podle primární struktury je lze rozdělit do tří skupin: ponericiny G, W a L. Ponericiny G je skupina sedmi peptidů, které sdílejí podobnou sekvenci s cecropiny a vykazují antimikrobiální a insekticidní aktivitu. Šest AMP ze skupiny ponericinů W má až 70% podobnost s melittinem a byla u nich dokázána aktivita proti bakteriím, plísním, insekticidní aktivita a na rozdíl od ostatních také hemolytická aktivita. Dva zástupce má 3. skupina ponericiny L. U ponericinu L2 byla dokázána jen antimikrobiální aktivita¹³⁷.

Jed australského mravence *Myrmecia pilosula* obsahuje nezvyklé AMP pilosuliny^{138,139,140} (Tabulka 3), které často vytvářejí dimerní formy skládající se buď ze dvou stejných (homodimer) nebo ze dvou různých, ale podobných řetězců (heterodimer) spojených disulfidickým můstkem. Tyto peptidy vykazují antimikrobiální vlastnosti a schopnost uvolňovat histamin ze žírných buněk. Sekundární struktura nebyla u pilosulinů podrobněji zkoumána. Např. pilosulin 5 má N-terminální část podobnou s mastoparany a tak se dá očekávat, že alespoň tato část bude vytvářet amfipatický α -helix¹⁴⁰.

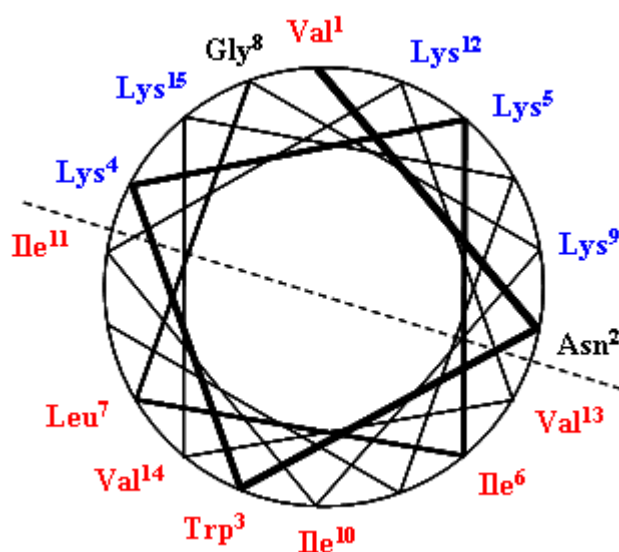
Tabulka 3: Přehled sekvencí vybraných zástupců AMP izolovaných z jedu mravenců

Organismus	Název AMP	Primární struktura
<i>P. goeldii</i>	Ponericin G1	GWKDWAKKAGGWLKKKGPGMAKAALKAAMQ
<i>P. goeldii</i>	Ponericin L1	LLKELWTKMKGAGKAVLGKI KGLL-NH ₂
<i>P. goeldii</i>	Ponericin W1	WLGSALKIGAKLLPSVVGLFKKKKQ
<i>M. pilosula</i>	Pilosulin 5	DVKGMKKAIKEILD [↓] CVIEKGYDKLAAKLKKVIQQLWE DVKGMKKAIKEILDCVIEKGYDKLAAKLKKVIQQLWE
<i>T. bicarinatum</i>	Bicarinalin	KIKIPWGKVKDFLVGGMKAV-NH ₂

V jedu mravence *Tetramorium bicarinatum* byl objeven jen jeden AMP nazvaný bicarinalin, který je zcela odlišný od výše zmíněných AMP z jedu mravenců. Bicarinalin obsahuje 20 aminokyselin, je na C-konci amidovaný, vykazuje vysokou antimikrobiální aktivitu a jen slabou hemolytickou aktivitu¹⁴¹.

1.5. Strukturně-aktivitní studie antimikrobiálních peptidů

Studie strukturně-aktivitních vztahů (structure-activity relationship, SAR) spočívá v systematické modifikaci peptidů, nejčastěji záměnou jednotlivých aminokyselin za jiné, která většinou vede ke změně jednoho či více fyzikálně chemických parametrů peptidu a následně změně biologické aktivity. Předmětem SAR studií jsou často α -helikální AMP a to především kvůli jejich kratší délce, která je výhodná pro chemickou syntézu, a také pro jejich relativně jednoduchou strukturu.



Obrázek 6: Znáznornění α -helikální struktury LL-III v Edmunsově kruhové projekci. Přerušovaná čára znázorňuje polární úhel mezi polární a nepolární částí amfipatické struktury peptidu, který je v případě LL-III 180° . Hydrofobní aminokyseliny jsou znázorněné červeně, hydrofilní aminokyseliny bazické (Arg a Lys) modře a ostatní hydrofilní černě.

Pro α -helikální AMP bylo odvozeno několik parametrů, které jsou podstatné pro antimikrobiální a hemolytické účinky. Mezi ty nejdůležitější patří: délka peptidu, obsah α -helixu, celkový pozitivní náboj (kationicita), hydrofobicita, amfipaticita a velikost polárního úhlu (určuje míru relativního rozdělení amfipatické α -struktury na polární a nepolární část, viz Obr. 6). Hodnotit vlivy jednotlivých parametrů je velice obtížné, protože změna jednoho faktoru většinou vede také k určité změně dalších faktorů. Konečným cílem SAR studií je vylepšení vlastností AMP pro jejich případné využití jako léčivo. Ideální AMP by měl mít co nejlepší terapeutický index. Terapeutický index se vyjadřuje jako poměr hemolytické aktivity k antimikrobiální aktivitě (LC_{50}/MIC). Jinými slovy by ideální AMP měl mít vysokou

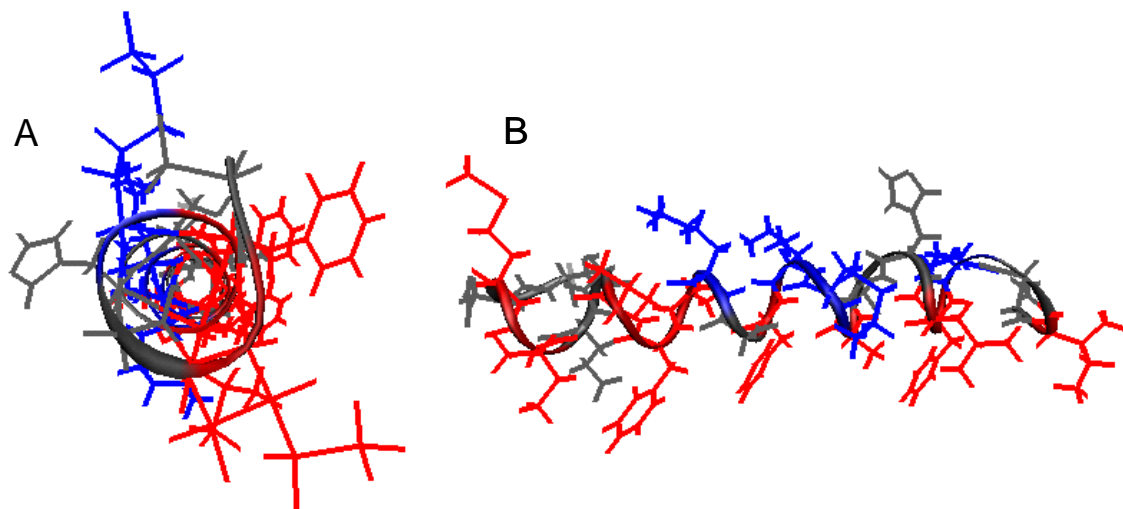
antimikrobiální aktivitu a minimální toxicitu proti buňkám léčeného organismu. Kromě toho by měl být také stabilní v tělních tekutinách a v místě uvažované aplikace, neboli odolný vůči proteolytickému štěpení.

1.5.1. Obsah α -helixu v antimikrobiálních peptidech

Jak již bylo řečeno, peptidy ze skupiny α -helikálních AMP nabývají uspořádané konformace pouze v přítomnosti biologických membrán, látek napodobujících membránu anebo organických látek podporujících vznik α -helixu. Ze SAR studií je zřejmé, že α -helicitita, tedy schopnost vytvářet helikální strukturu, je důležitější pro cytolytickou aktivitu proti eukaryotním buňkám^{23,142}. Např. melectin má helikální strukturu narušenou Pro v pozici 11. Jeho záměna za Lys, Ala nebo Gly vedla ke značnému zvýšení α -helicity, což antimikrobiální aktivitu výrazně neovlivnilo, ale došlo k významnému zvýšení hemolytické aktivity. Flexibilní ohyb způsobený Pro, tzv. *Pro kink*, tedy přispívá k selektivitě tohoto AMP¹³². Podobný efekt má u lasioglossinů Gly na pozici 8. Substituce Gly8 za jiné aminokyseliny vedla ke snížení antimikrobiálních aktivit proti patogenním bakteriím *S.a.* a *P.a.*¹³⁴.

1.5.2. Amfipaticita

Amfipaticita je způsobena rozmístěným hydrofilních aminokyselin na jednu část peptidu a hydrofobních aminokyselin na opačnou stranu molekuly (Obr. 7).



Obrázek 7: Znázornění amfipaticity lineárního AMP magainu-2 v α -helikální struktuře v kolmém pohledu ve směru osy (A) a při pohledu z boku (B). Hydrofobní aminokyseliny jsou znázorněné červeně, hydrofilní aminokyseliny bazické (Arg a Lys) modře a ostatní hydrofilní šedě.

Jejím kvantitativním vyjádřením je hydrofobní moment, který je definován jako průměrný vektorový součet hydrofobních příspěvků jednotlivých aminokyselin
$$\mu_H = \frac{1}{N} \{ [\sum_{n=1}^N H_n \cos(n\delta)]^2 + [\sum_{n=1}^N H_n \sin(n\delta)]^2 \}^{1/2},$$
 kde H odpovídá hodnotě hydrofobicity aminokyseliny n , δ je úhel mezi dvěma sousedními aminokyselinami (100° pro α -helix) a N je počet aminokyselin¹⁴³. Většina AMP získává amfipatický charakter až po vytvoření uspořádané struktury. Ač je amfipatická struktura důležitá pro účinek peptidů, ukázalo se, že dokonalá amfipaticita není vždy žádoucí pro optimální efekt a specifitu^{16,134}.

1.5.3. Náboj peptidu

Vyšší výskyt pozitivně nabitých aminokyselin (Arg, Lys) v sekvenci vytvářející celkový pozitivní náboj peptidu je charakteristická a zásadní vlastnost kationických AMP. Počet kladně nabitých aminokyselin se v různých peptidech liší a nejčastěji se pohybuje od 2 do 9¹⁶. Svoji roli hraje také rozložení kladného náboje, který může být soustředěn do jedné části struktury nebo je rozložen podél celé struktury. Antimikrobiální aktivitu lze často vylepšit zavedením dalších bazických aminokyselin do sekvence AMP a tím zvýšit celkový náboj peptidu. Toto platí jen do určité míry, protože při příliš velkém navýšení kladného náboje peptidu dochází opět ke snížení účinnosti AMP. V tomto případě pak nejspíše dochází k tak silnému navázání na kladně nabitě komponenty buněčné stěny, čímž se znemožní dosažení cílové buněčné membrány^{23,144}.

1.5.4. Hydrofobicita

Celková hydrofobicita peptidu, která je dána obsahem a druhem hydrofobních aminokyselin je další důležitou vlastností AMP. Tak jako kationicita tak také hydrofobicita musí pro dostatečný antimikrobiální účinek peptidu nabývat optimálních hodnot. Pokud u AMP posouváme celkovou hydrofobicitu mimo toto optimum dochází k poklesu antimikrobiálního účinku. Příliš vysoká hydrofobicita může snižovat rozpustnost peptidu ve vodě, případně způsobit shlukování AMP a tím znemožnit dosažení cíle, který je v tomto případě bakteriální membrána. Kromě toho se může projevit nežádoucí toxický efekt vůči eukaryotním buňkám. Naopak příliš nízká hydrofobicita nemusí být dostatečná pro interakci s hydrofobními řetězci fosfolipidů v dvouvrstvě membrány¹⁴⁵. Průměrně v AMP zaujímají hydrofobní aminokyseliny 40-60 % obsahu a nejčastěji jde o Leu, Ile a Ala. Aromatické hydrofobní aminokyseliny Phe a Tyr se nevyskytují tak často na rozdíl od častějšího Trp²⁴.

1.5.5. Zastoupení aminokyselin v antimikrobiálních peptidech

U kationických AMP bychom stěží hledali neměnné aminokyseliny v dané pozici, ale určitý stupeň konzervovanosti lze najít mezi peptidy z jedné rodiny. Více se opakují aminokyseliny se stejnými vlastnostmi (nabité, hydrofobní, stabilizující helix atd.) než konkrétní aminokyseliny³². V α -helikálních AMP se kladně nabitě aminokyseliny vyskytují až o 50 % častěji než je průměrné zastoupení těchto aminokyselin v proteinech. Naopak záporně nabitě Glu nebo Asp se v kationických AMP vyskytují o 75 % méně než je průměr. Hydrofobní aromatické aminokyseliny jsou také vzácné. Z těchto aminokyselin se nejčastěji v blízkosti N-konce peptidu vyskytuje Trp, který se ukázal být v mnoha případech důležitou aminokyselinou pro antimikrobiální účinek. Oblak π -elektronů nad a pod aromatickým kruhem Trp je schopný interagovat s kladně nabitými aminokyselinami a tím napomáhat jejich penetraci i do silně hydrofobní lipidické části dvouvrstvy. Další průnik dvouvrstvou je ulehčen rozrušením hydrofobních interakcí lipidických acylových skupin objemnou indolovou skupinou¹⁶.

V sekvenci α -helikálních AMP převažují aminokyseliny Lys, Ala, Leu, které stabilizují α -helikální strukturu. Na první pozici se často vyskytuje Gly, který je obecně častou N-terminální aminokyselinou v α -helixu (tzv. *N-capping residues*)¹⁴⁶, a který také může zvyšovat odolnost peptidu vůči účinkům aminopeptidas. Velice běžná modifikace u AMP vytvářející α -helikální strukturu je amidace na C-konci. Dochází tím ke vzniku další vodíkové vazby mezi amidovou $-NH_2$ skupinou a kyslíkem $-CO-NH-$ vazby aminokyseliny stojící o tři aminokyseliny zpět v sekvenci. Tím dojde ke stabilizaci α -helixu v jeho C-koncové části mající za následek zvýšení antimikrobiální aktivity. Naopak odstranění amidové skupiny za vzniku volné karboxylové skupiny tedy většinou vede ke snížení antimikrobiální aktivity¹³³ a naopak zavedení amidované skupiny vylepší antimikrobiální aktivitu¹³¹.

2. Cíle dizertační práce

Předkládaná dizertační práce se zaměřuje na AMP z jedu blanokřídlého hmyzu.

Hlavní cíle práce byly následující:

- izolace a identifikace nových AMP z jedových váčků volně žijících včel
- izolace a identifikace AMP z ovipozičního sekretu, který produkuje pilořitka olšová
- podrobnější výzkum vybraných AMP:
 - syntéza peptidů
 - návrh analogů
 - strukturní studie pomocí CD a NMR
 - testování antimikrobiálních a hemolytických aktivit
 - strukturně-aktivitní studie
 - vylepšení terapeutického indexu AMP
 - stabilita peptidů v krevním séru
 - interakce s umělými buněčnými membránami
 - interakce s vnější a vnitřní membránou Gram-negativní bakterie *E.c.*

3. Metody

Metody použité k vypracování této dizertační práce jsou podrobně popsány v příslušných publikacích (Přílohy 1-4). Pro přehlednost jsou zde metody popsány stručně a podrobnější popis metod je zde uveden pro ty výsledky, které nejsou součástí přiložených publikací.

3.1. Izolace antimikrobiálních peptidů

3.1.1. Izolace antimikrobiálních peptidů z jedových váček

Jedové váčky pocházely ze včel nasbíraných na území České republiky entomology Jakubem Strakou z Univerzity Karlovy v Praze nebo Oldřichem Hovorkou z ÚOCHB AV ČR, v.v.i. Z 2-12 jedinců byly vypreparovány jedové váčky, které byly uchovávány při -20°C ve směsi ACN/ H_2O (1:1) s 0,1 nebo 0,5 % TFA. Obsah váček byl extrahován výše uvedenou směsí. Extrakt byl centrifugován a supernatant byl dělen pomocí RP-HPLC (Agilent Technologies 1200 Series) na koloně Vydac C-18, $250 \times 4,6$ mm; $5\text{ }\mu\text{m}$ (Grace Vydac, USA) při průtokové rychlosti 1 ml/min. Byl použit lineární gradient mobilní fáze od 100 % směsi A (5 % ACN/ H_2O s 0,1 % TFA) do 100 % směsi B (70 % ACN/ H_2O s 0,1 % TFA) během 60 min. Eluce byla monitorována při 220 a 280 nm. Látky absorbující při 220 nm byly ručně odchytávány do mikrozkušavek a rozpouštědlo mobilní fáze bylo následně odpařeno v rotačním vakuovém koncentrátoru (Speed-Vac, Labconco, USA). Vysušené vzorky byly rozpuštěny ve vodě (obvykle 10-20 μl) a testovány na antimikrobiální aktivitu kapkovací dvouvrstvou metodou proti *M.l.* (podrobněji viz kapitola 3.4.1). Látky, u kterých se projevila antimikrobiální aktivita, byly podrobeny další analýze hmotnostní spektrometrií (MS) a Edmanovým odbouráváním. Viz také Příloha 1, 2 a 4.

3.1.2. Izolace defensinu ze sekretu vosy pilořitky olšové

Sekret z pilořitky olšové byl dodán Petrem Šrůtkou z České zemědělské univerzity v Praze. Sekret byl odebrán z 30-ti dospělých samic pilořitky olšové (*X. camelus*) na jaře roku 2011 a 2012 a extrahován směsí ACN/ H_2O (1:1) obsahující 0,5 % TFA. Extrakt byl naředěn směsí 5 % ACN/ H_2O s 0,1 % TFA (10 ml) a dvakrát ultrafiltrován v ultrafiltračních nádobkách (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units) s membránou 100 kDa při 2400 g, 20 min. Získaný filtrát byl lyofilizován a rozpuštěn ve směsi 5 % ACN/ H_2O s 0,1 % TFA (10 ml) a ultrafiltrován podruhé v nádobkách s membránou 3 kD při 2400 g, 20 min. Retenát zachycený membránou byl lyofilizován. Získaný lyofilisát byl rozpuštěn v 50 μl směsi 5 %

ACN/H₂O s 0,1 % TFA a následně byl dělen v několika po sobě jdoucích izolacích pomocí RP-HPLC (Agilent Technologies 1200 Series) na koloně Vydac C-18, 250 × 4,6 mm; 5 μm (Grace Vydac, USA) při průtokové rychlosti 1 ml/min. Byl použit lineární gradient od 100 % směsi A (5 % ACN/H₂O s 0,1 % TFA) do 100 % směsi B (70 % ACN/H₂O s 0,1 % TFA) během 60 min a detekce při 220 a 280 nm. Frakce vykazující aktivitu proti *M.l.* byly spojeny a rozpouštědlo mobilní fáze bylo odpařeno na rotačním vakuovém koncentrátoru (Speed-Vac, Labconco, USA). Obdržený materiál byl rozpuštěn v 0,1M pufru octanu amonného, pH = 4,4 (50 μl), a dále frakcionován pomocí vysokoúčinné gelové permeační chromatografie (SE-HPLC) s využitím přístroje Agilent Technologies 1200 Series na koloně Bio-Sil SEC-125, 300 × 7,8 mm, 5 μm (Bio-Rad, Hercules, USA) při průtokové rychlosti 1 ml/min. Byla použita mobilní fáze obsahující 0,1 M pufr octanu amonného, pH = 4,4 a detekce při 220 a 280 nm. Antimikrobiální aktivita proti *M.l.* odpovídající hledanému defensinu byla detekována pouze v jedné frakci. Pufr byl odpařen a defensin byl znovu přečištěn RP-HPLC na koloně Vydac C-18, 250 × 4,6 mm; 5 μm (Grace Vydac, USA) při průtokové rychlosti 1 ml/min. Byl použit lineární gradient od 70 % směsi A (5 % ACN/H₂O s 0,1 % TFA) do 50 % směsi B (70 % ACN/H₂O s 0,1 % TFA) během 60 min a detekce při 220 a 280 nm.

3.2. Identifikace antimikrobiálních peptidů

3.2.1. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektra peptidů byla měřena na hmotnostním spektrometru Micromass Q-ToF Micro (Waters, USA) vybaveným ionizací elektrosprejem s hybridním analyzátozem složený z kvadrupólového analyzátoru (Q) a ortogonálním analyzátozem doby letu (TOF). Přístroj umožňuje měření v MS i MS/MS módu. Molekulová hmotnost s vysokým rozlišením byla měřena na LTQ Orbitrapu XL (Thermo Fisher Scientific, USA). Jedná se o hybridní hmotnostní spektrometr s Fourierovou transformací kombinující hmotnostní analyzátozem lineární iontovou past a elektrostatickou orbitální past (Orbitrap). Ionty byly generovány ionizací elektrosprejem. Tento přístroj umožňuje získat spektra s vysokým rozlišením. Přístroj umožňuje měření v MS i MS/MS módu. Viz také Příloha 1, 2, 3 a 4.

3.2.2. Edmanovo odbourávání

Sekvence peptidů byla stanovena Edmanovým odbouráváním ve spolupráci se Zdeňkem Voburkou (ÚOCHB AV ČR, v.v.i.) na přístroji Procise 491 HT Protein Sequencing System (PE Applied Biosystems, USA). Podrobněji viz Příloha 1, 2 a 4.

3.2.3. Stanovení disulfidických můstků

Propojení cysteinů v peptidech bylo určeno kombinací enzymového štěpení trypsinem a analýzou pomocí MS. Fragmenty získané z enzymového štěpení byly izolovány pomocí RP-HPLC a z jejich hmotností stanovených ESI-QToF MS bylo odvozeno propojení jednotlivých disulfidických můstků. Podrobněji viz Příloha 2.

3.2.4. Štěpení defensinu z pilořitky olšové endoproteinasou Lys-C

Vysušený vzorek defensinu, po závěrečném přečištění RP-HPLC, byl rozpuštěn ve 20 μ l 50 mM roztoku hydrogenuhličitanu amonného. K roztoku bylo přidáno 9 μ l zásobního roztoku endoproteinasy Lys-C (0,1 mg/ml) a směs byla inkubována při 37°C po dobu 24 hod. Štěpení bylo zastaveno přidáním roztoku 10% TFA (1 μ l) a poté byla směs rozdělena na frakce pomocí RP-HPLC (Agilent Technologies 1200 Series) na koloně Vydac C-18, 250 \times 4,6 mm; 5 μ m (Grace Vydac, USA) při průtokové rychlosti 1 ml/min. Byl použit lineární gradient od 70 % směsi A (5 % ACN/H₂O s 0,1 % TFA) do 50 % směsi B (70 % ACN/H₂O s 0,1 % TFA) během 60 min a detekce při 220 a 280 nm. Získané peptidové fragmenty byly podrobeny Edmanovu odbourávání.

3.3. Syntéza peptidů

3.3.1. Syntéza lineárních peptidů

Peptidy byly připraveny manuální syntézou na pevné fázi podle protokolu N^α-Fmoc metody v polypropylenových stříkačkách s teflonovým filtrem. Pro kondenzaci byla použita směs činidel *N,N'*-diisopropylkarbodiimidu a 1-hydroxybenzotriazolu v *N,N*-dimethylformamidu (DMF). Fmoc skupina byla odstraňována 20% piperidinem v DMF. Po navázání všech aminokyselin byl peptid zcela ochráněn a odštěpen z pryskyřice působením směsi TFA/thioanisolu/H₂O/ethan-1,2-dithiol/triisopropylsilan (90:3:2,5:2,5:2). Pokud sekvence peptidu neobsahovala Cys nebo Met byla ke štěpení použita směs TFA/H₂O/triisopropylsilan (95:2,5:2,5). Poté byl peptid vysrážen *tert*-butylmethyletherem

Surový peptid byl vyčištěn pomocí preparativní RP-HPLC. Čistota peptidů byla kontrolována na analytickém RP-HPLC a identita peptidů byla ověřena MS. Podrobněji viz Příloha 1, 2, 3 a 4.

3.3.2. Syntéza peptidů s disulfidickými můstky

Pro syntézu peptidů s dvěma disulfidickými můstky byla použita jednokroková a dvoukroková cyklizace. Pro jednokrokovou cyklizaci byl připraven lineární peptid s odstraněnými všemi chránícími skupinami. Cyklizace probíhala oxidací vzduchem v 0,1M pufru octanu amonného, pH = 7,8 za současné tvorby dvou disulfidických můstků. Dvoukroková cyklizace probíhala regioselektivním způsobem, kdy byl připraven lineární peptid s chránící skupinou pouze na dvou Cys. První disulfidický můstek vznikl oxidací vzduchem v 0,1M pufru octanu amonného, pH = 7,8. Poté byly postranní chránící skupiny zbylých dvou cysteinů odstraněny 0,1M roztokem I₂ v methanolu. Během této reakce došlo k tvorbě druhého disulfidického můstku. Podrobněji viz Příloha 2 a 3.

3.4. Stanovení biologických aktivit

3.4.1. Stanovení antimikrobiální aktivity

Po izolacích byla antimikrobiální aktivita frakcí získaných z RP-HPLC při 220 nm stanovována kapkovací dvouvrstvou technikou na Petriho miskách proti citlivé bakterii *M.l.*¹³². Viz také Příloha 1, 2 a 4.

Tento test byl také použit pro stanovení antimikrobiální aktivity proti *M.l.*, *B.s.*, *E.c.* a *P.a.* defensinu z pilořítky olšové.

Antimikrobiální aktivita všech syntetických čistých peptidů byla stanovena kvantitativně a vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC). MIC byla stanovena z růstových křivek jednotlivých bakterií (Gram-pozitivní *M.l.* *B.s.* a *S.a.*, Gram-negativní *E.c.* a *P.a.*) a kvasinek (*C.a.*) na mikrotitrační destičce, které byly inkubovány 20 hod při 37°C za stálého míchání. Absorbance se měřila při 540 nm každých 15 min v přístroji Bioscreen C (Oy Growth Curves AB Ltd., Finsko). Každá látka byla testována minimálně ve třech nezávislých experimentech v duplikátech. Podrobněji viz Příloha 1, 2, 3 a 4.

3.4.2. Hemolytická aktivita

Hemolytická aktivita byla vyjádřena jako koncentrace peptidů schopná lyzovat 50 % lidských nebo krysích červených krvinek (hodnoty LC_{50}). Po centrifugaci směsi červených krvinek s peptidem byla absorbance vzniklého supernatantu měřena při 540 nm na spektrometru Tecan infinite M200 PRO reader (Tecan Group Ltd., Švýcarsko). Pro kontrolu nulové hemolýzy byly použity červené krvinky ve fyziologickém roztoku a pro kontrolu 100% hemolýzy červené krvinky s 0,2 % Tritonem X-100 ve fyziologickém roztoku. Každý peptid byl testovaný minimálně ve dvou nezávislých experimentech v duplikátech. Podrobněji viz Příloha 1, 2, 3 a 4.

3.5. Stanovení struktury

3.5.1. Cirkulární dichroismus

Cirkulární dichroismus byl měřen Lucií Bednárovou a Petrem Maloněm ze servisní skupiny Molekulární spektroskopie na ÚOCHB AV ČR, v.v.i. na přístroji Jasco 815 (Japan). Peptidy byly měřeny ve vodě, ve směsi TFE/H₂O (10-50 % TFE) a v přítomnosti SDS (0,16-16 mM SDS). Finální koncentrace peptidu byla 0,25 mg/ml. Podrobněji viz Příloha 1, 2 a 4.

3.5.2. NMR

NMR spektra byla měřena Milošem Buděšínským z vědecko-servisní skupiny NMR spektroskopie, ÚOCHB AV ČR, v.v.i. a jejich struktura určena ve spolupráci s Václavem Veverkou z vědecko-servisní skupiny Strukturní biologie, ÚOCHB AV ČR, v.v.i. Peptidy byly měřeny na přístroji Bruker AVANCE 600 MHz. Podrobněji viz Příloha 1, 3 a 4.

3.6. Stabilita peptidů v séru

Stabilita peptidů byla stanovena v 25% lidském séru ve vodě. Použití zředěného séra ulehčuje provedení a vyhodnocování experimentu a zároveň nemá vliv na specifitu štěpení peptidu, pouze se úměrně prodlužuje doba štěpení. Pro sledování průběhu štěpení byl peptid inkubován po různě dlouhou dobu (0, 1, 4, 8, 24, 48 hod). Pro určení rychlosti a místa štěpení byly vzorky analyzovány RP-HPLC a MS. Množství neštěpeného peptidu v daných časových intervalech bylo vyjádřeno jako procento plochy píku vztaženo k ploše píku pro peptid v čase 0 hod (100 %). Podrobněji viz Příloha 4.

3.7. Studium vlivu peptidů na buněčné membrány

3.7.1. Tvorba lipozómů

Velké jednovrstevné vezikuly (LUV) byly připraveny z pěti různých fosfolipidů v různých poměrech (PC:Chol 9:1, PE:PG 7:3, PE:PG:CL 1,5:8:0,5, PE:PG:CL 1,5:6:2,5) metodou opakovaného zmrazování a rozmrazování. Směs fosfolipidů byla rozpuštěna v chloroformu, který byl následně odpařen proudem dusíku tak, aby vznikl souvislý film na stěně skleněné zkumavky. Tento film byl dále vysušen v exsikátoru pod vakuem přes noc. Vysušený film byl suspendován ve fosfátovém pufru (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH = 7,4) a následně byla suspenze v pěti cyklech opakovaně zmrazována (v suchém ledu) a rozmrazována (vodní lázeň 37°C). Požadované velikosti lipozómů a jejich homogennosti jsme dosáhli protlačováním (31x) přes polykarbonátovou membránu s průměrem pórů 100 nm (Nuclepore Track-Etched Membranes, Avanti Polar Lipids, USA) s využitím Mini-Extruderu (Avanti Polar Lipids, USA). Viz také Příloha 3.

3.7.2. Měření fluorescence Trp obsaženého v antimikrobiálních peptidech

Změna fluorescence Trp v přítomnosti různé koncentrace vezikul byla měřena v mikrotitračních destičkách na spektrometru Tecan Infinite 200 (Tecan Group Ltd., Švýcarsko). Do jamek byl přidán roztok peptidu ve fosfátovém pufru (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH = 7,4) do výsledné koncentrace 10 μM a roztok LUV do výsledné koncentrace 0, 40, 80, 160, 240 nebo 320 μM tak, aby výsledný objem byl 300 μl. Před započítáním měření byla směs třepána a nechána reagovat po dobu 10 min při laboratorní teplotě. Fluorescence Trp byla excitována při 280 nm a emisní spektrum skenováno od 300 do 400 nm. Viz také Příloha 3.

3.7.3. Zhášení fluorescence Trp akrylamidem

Experiment byl proveden v mikrotitračních destičkách na spektrometru Tecan Infinite 200 (Tecan Group Ltd., Švýcarsko). Do jamek byl přidán roztok peptidu do výsledné koncentrace 10 μM, roztok LUV do výsledné koncentrace 240 μM a akrylamid do výsledné koncentrace 0, 60, 120, 180, 240 nebo 300 mM tak, aby výsledný objem byl 300 μl. Před započítáním měření byla směs nechána reagovat po dobu 10 min při laboratorní teplotě za současného třepání. Aby byla potlačena absorbance akrylamidu, byla fluorescence Trp excitována při 295 nm a emise fluorescence byla zaznamenána při 350 nm. Zhášení

fluorescence tryptofanu akrylamidem bylo vyjádřeno jako Stern-Volmerova konstanta (K_{SV}). Hodnoty K_{SV} byly odečteny ze směrnice přímek po vynesení do grafu podle vztahu $F_0/F = 1 + K_{SV}[Q]$, kde F_0 je fluorescence tryptofanu bez přítomnosti akrylamidu a F je fluorescence tryptofanu v přítomnosti dané koncentraci akrylamidu $[Q]$. Viz také Příloha 3.

3.7.4. Stanovení propustnosti vnější a vnitřní membrány bakterie *E.c.*

Pro stanovení schopnosti peptidů zvýšit propustnost vnější membrány buněk *E.c.* byla použita fluorescenční činidlo 1-*N*-fenyl-naftylamin (NPN). Měření probíhalo v mikrotitračních destičkách na spektrometru Tecan Infinite 200 (Tecan Group Ltd., Švýcarsko). Buňky *E.c.* byly kultivovány v LB mediu při kontinuálním třepání při 37°C 3-5 hodin do střední logaritmické fáze růstu. Poté byly dvakrát promyty 5M HEPES pufrem, pH = 7,5 a následně suspendovány v HEPES pufru obsahující 20 μ M NPN na koncentraci s výslednou $OD_{600} = 0,8$. Do jamek bylo přidáno 50 μ l této směsi k 50 μ l roztoku peptidu v HEPES pufru. Výsledná koncentrace peptidu byla 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10 nebo 20 μ M v HEPES pufru. Změny fluorescence byly sledovány při excitační vlnové délce 350 nm a emisní vlnové délce 420 nm po dobu 30 minut.

Schopnost peptidu zvyšovat propustnost vnitřní membrány *E.c.* byla studována měřením aktivity β -galaktosidasy uvolněné z buněk bakterií s využitím *o*-nitrofenyl- β -D-galaktosidu (ONPG) jako substrátu. Měření probíhalo na mikrotitrační destičce v přístroji Bioscreen C (Oy Growth Curves AB Ltd., Finsko). Buňky *E.c.* byly kultivovány v LB mediu s 2% laktosou při kontinuálním třepání při 37°C, 3-5 hodin do střední logaritmické fáze růstu. Bakterie byly dvakrát promyty 10mM fosfátovým pufrem se 100 mM NaCl (pH = 7,4) a poté suspendovány na hodnotu $OD_{600} = 0,8$. Do jamek bylo napipetováno 100 μ l suspenze bakterií k 100 μ l směsi ONPG a různé koncentraci peptidů. Výsledná koncentrace ONPG byla 1,5 mM a peptidů 0, 1, 2,5, 5, 10 nebo 20 μ M. Hydrolýza ONPG a vznik *o*-nitrofenolu byla spektrometricky pozorována při 420 nm po dobu 90 min. Viz také Příloha 3.

3.8. Transmisní elektronová mikroskopie

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) byla provedena Jitkou Štokrovou (ÚOCHB AV ČR, v.v.i.) na buňkách *B.s.* Vizualizace byla provedena metodou negativního barvení na přístroji transmisním elektronovém mikroskopu JEOL JEM/1200EX (Joel Ltd., Japonsko). Podrobněji viz Příloha 2.

4. Výsledky

Během mého doktorského studia jsem se podílela na objevu celé řady AMP z jedu volně žijících včel. Pouze některé z těchto peptidů byly předmětem rozsáhlejšího studia, a proto jsou jim věnované samostatné kapitoly této dizertační práce. V následujících kapitolách (kapitoly 4.1.- 4.3) jsou stručně shrnuty nejdůležitější výsledky již publikované ve čtyřech odborných časopisech. Publikace jsou zařazeny v Přílohách 1-4. Získala jsem i další cenné výsledky, které nebyly zatím sepsány do publikace a tudíž je uvádím jako součást této dizertační práce v následujících kapitolách (kapitoly 4.1. a 4.4.). Každá kapitola je věnována AMP z jiného organismu.

Kapitola 4.1. se věnuje halictinům, lineárním α -helikálním AMP z jedu včely ploskočelky šestipásé, jejich izolaci a strukturně-aktivitní studii (Příloha č. 1). Dále tato kapitola obsahuje nepublikované výsledky studia mechanismu účinku a jejich vliv na modely buněčných membrán a membrány buněk *E.c.*

Kapitola 4.2. se zabývá cyklickým AMP lasiocepsinem z jedu včely ploskočelky velkohlavé. V první části kapitoly je popsán vliv disulfidických můstků na antimikrobiální aktivitu lasiocepsinu (Příloha č. 2). Druhá část kapitoly se týká studia struktury lasiocepsinu a jeho interakce s membránami (Příloha 3).

Kapitola 4.3. obsahuje výsledky strukturně-aktivitní studie macropinu, nového lineárního α -helikálního AMP z jedu včely olejnice žlutohohé. Zaměřuje se na vliv změny struktury na biologické účinky a studium stability peptidů v krevním séru (Příloha 4).

Poslední kapitola 4.4. je věnována izolaci a stanovení primární sekvence nového hmyzího defensinu z pilořítky olšové. Tyto výsledky nebyly zatím publikované.

4.1. Halictiny

Část výsledků týkající se dvou nových AMP byla publikovaná v časopise *Amino Acids* (Příloha 1): Monincová, L., Buděšínský, M., Slaninová, J., Hovorka, O., Cvačka, J., Voburka, Z., Fučík, V., Borovičková, L., Bednárová L., Straka J., & Čerovský, V. (2010). Novel antimicrobial peptides from the venom of the eusocial bee *Halictus sexcinctus* (Hymenoptera: Halictidae) and their analogs. *Amino Acids*, 39(3), 763-775.

Podíl autorky dizertační práce na této publikaci je asi 40 %: izolace, MS, návrh analogů, syntéza, vyhodnocení experimentálních dat, podíl na sepsání a revizi publikace. Výsledky této práce jsou též předmětem národního patentu č. 301719 a mezinárodního patentu č. WO2010091651 A2.

V jedu včely ploškočelky šestipásé (*Halictus sexcinctus*) byly objeveny dva AMP pojmenované halictiny (HAL), HAL-1: GMWSKILGHLIR-NH₂ a HAL-2: GKWMSLLKHILK-NH₂. Jak ukázalo měření CD a NMR, tyto halictiny vytvářejí v přítomnosti SDS nebo TFE α -helikální strukturu. Oba dva peptidy vykazují antimikrobiální aktivitu proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím a proti kvasinkám *C.a.* a mírnou hemolytickou aktivitu (Příloha 1, Table 1, Table 2). Tyto peptidy lze zařadit do skupiny amfipatických α -helikálních kationických AMP.

4.1.1. Strukturně-aktivitní studie halictinů

Pro studium vlivu různých strukturních parametrů na antimikrobiální a hemolytickou aktivitu bylo postupně navrženo a syntetizováno 51 analogů od obou halictinů (Příloha 1, Table 1, Table 2). Současně jsme se pokusili získat analog s lepším terapeutickým indexem. První modifikace halictinů byly zaměřeny na zvýšení selektivity. Do sekvence byly zabudovány aminokyseliny, které měly narušit α -helikální strukturu peptidu (methyллеucin, D-aminokyseliny, Pro, β -alanin), která, jak se ukázalo, je spíše příčinou nežádoucí hemolytické aktivity než aby byla zásadní pro antimikrobiální aktivitu (viz kapitola 1.5.1). Většina těchto záměn opravdu vedla k narušení α -helikální struktury a k výraznému snížení hemolytické aktivity, ale bohužel také k výraznému snížení nebo ztrátě antimikrobiální aktivity. Jedinou výjimkou byl analog HAL-2/8 s D-Trp na pozici 3. Zde nedošlo k výrazné změně ani α -helikální struktury ani biologické aktivity.

V druhé skupině analogů jsme zvyšovali kladný náboj přírodních halictinů. Toho jsme dosáhli postupnou záměnou jedné, dvou nebo i tří aminokyselin za lysiny především na polární straně molekuly. Vliv samotného zvýšení náboje na aktivitu peptidu je těžko posouditelný, protože kromě náboje peptidu se mění zároveň i další parametry jako je celková hydrofobicita a hydrofobní moment. Zároveň odezva antimikrobiální aktivity se mezi jednotlivými bakteriemi liší (Příloha 1, Table 1, Table 2). Z výsledků je zřejmé, že k lepší antimikrobiální aktivitě nevede zvyšování kladného náboje peptidu za současného zvyšování polárního úhlu (HAL-1/4, HAL-1/12, HAL-2/1, HAL-2/3). Další analogy s jednou záměnou na polární straně molekuly vedly ke zlepšení aktivity především proti *P.a.* Mezi zajímavé analogy patří HAL-1/5 (výměna Ser4 za Lys) a HAL-2/2 (výměna Ser5 za Lys). Negativním faktem však zůstává jejich nenulová hemolytická aktivita. Tu se podařilo výrazně snížit při substituci dvou a tří aminokyselin. I tyto analogy mají zvýšenou aktivitu především proti *P.a.*, ale naopak se výrazně zhoršuje aktivita proti *S.a.* Za nejlepší peptid z této řady lze považovat HAL-1/10 s výměnou Ser4 a His9 za Lys.

Třetí sledovanou vlastností halictinů byla změna celkové hydrofobicity peptidu jako důsledek záměny aminokyselin. Pokud došlo k malému zvýšení hydrofobicity, tak antimikrobiální ani hemolytická aktivita nebyla nijak výrazně ovlivněna (př. HAL-2/6, HAL-2/13, HAL-2/11). Naopak snížení hydrofobicity vedlo k velkému snížení hemolytické aktivity, ale současně i k zhoršení antimikrobiální aktivity. Snížení aktivity proti bakteriím však v některých případech bylo podstatně nižší (např. HAL-2/9) než proti erytrocytům. Z výsledků je zřejmé, že Trp hraje v antimikrobiální aktivitě peptidu významnou roli, protože jeho záměna za jinou aminokyselinu vždy vedla k výraznému zhoršení antimikrobiálních účinků (Příloha 1, Table 1, Table 2).

Byly také připraveny enantiomerní formy HAL-1 a HAL-2 syntetizované z D-aminokyselin (HAL-1/22 a HAL-2/22), které si zachovaly velice podobnou antimikrobiální i hemolytickou aktivitu jako přírodní peptidy.

4.1.2. Studie interakcí halictinů s membránami

Dosud nepublikované byly výsledky interakce HAL-1 a jeho tří analogů s uměle vytvořenými membránami různého složení. Vzhledem k tomu, že HAL-1 obsahuje ve své sekvenci Trp, je možné využít jeho přirozenou fluorescenci pro studium interakce tohoto peptidu s umělými membránami. Připravili jsme velké jednovrstevné vezikuly (LUV) o různém složení fosfolipidů, které napodobují bakteriální nebo eukaryotní buněčnou membránu. Pro napodobení membrány *E.c.* jsme vytvořili negativně nabitě lipozómy složené z PE a PG v poměru 7:3. Negativně nabitě LUV složené z PE, PG a CL v poměru 1,5:8:0,5 nebo 1,5:6:2,5 slouží jako model membrány *B.s.* Protože eukaryotní buňky jsou na povrchu neutrální, model jejich membrány byl vytvořen z PC a Chol v poměru 9:1. Dále jsme přímo na buňkách bakterii *E.c.* studovali její narušení vnější a vnitřní membrány peptidy. Pro studium byl zvolen HAL-1 a jeho tři analogy: aktivní HAL-1/10, jeho enantiomer HAL-1/23, oba s výrazně nižší hemolytickou aktivitou než HAL-1 a HAL-1/13 s velmi nízkou antimikrobiální i hemolytickou aktivitou (Tabulka 4).

V první části experimentů jsme využili přirozenou fluorescenci Trp, která je velice citlivá na okolní prostředí. Při změně okolí Trp z polárního na nepolární dochází k posuvu jeho maxima v emisním spektru k nižším vlnovým délkám (tzv. *blue shift*). U anionických vezikulí jsme zaznamenali silnou interakci v přítomnosti všech tří aktivních peptidů (Obr. 8 A, B, C). Již při nejnižší koncentraci LUV (40 μ M) došlo k výraznému posuvu v emisním spektru což indikuje začlenění Trp do hydrofobního prostředí membránové dvouvrstvy. Tento posuv se při vyšší koncentraci LUV už dále výrazně neměnil. Pro všechny tři aktivní peptidy platí, že k

nejméně silnější interakci, tedy k největšímu posuvu maxima spektra, docházelo v přítomnosti lipozómů s obsahem CL 25 %.

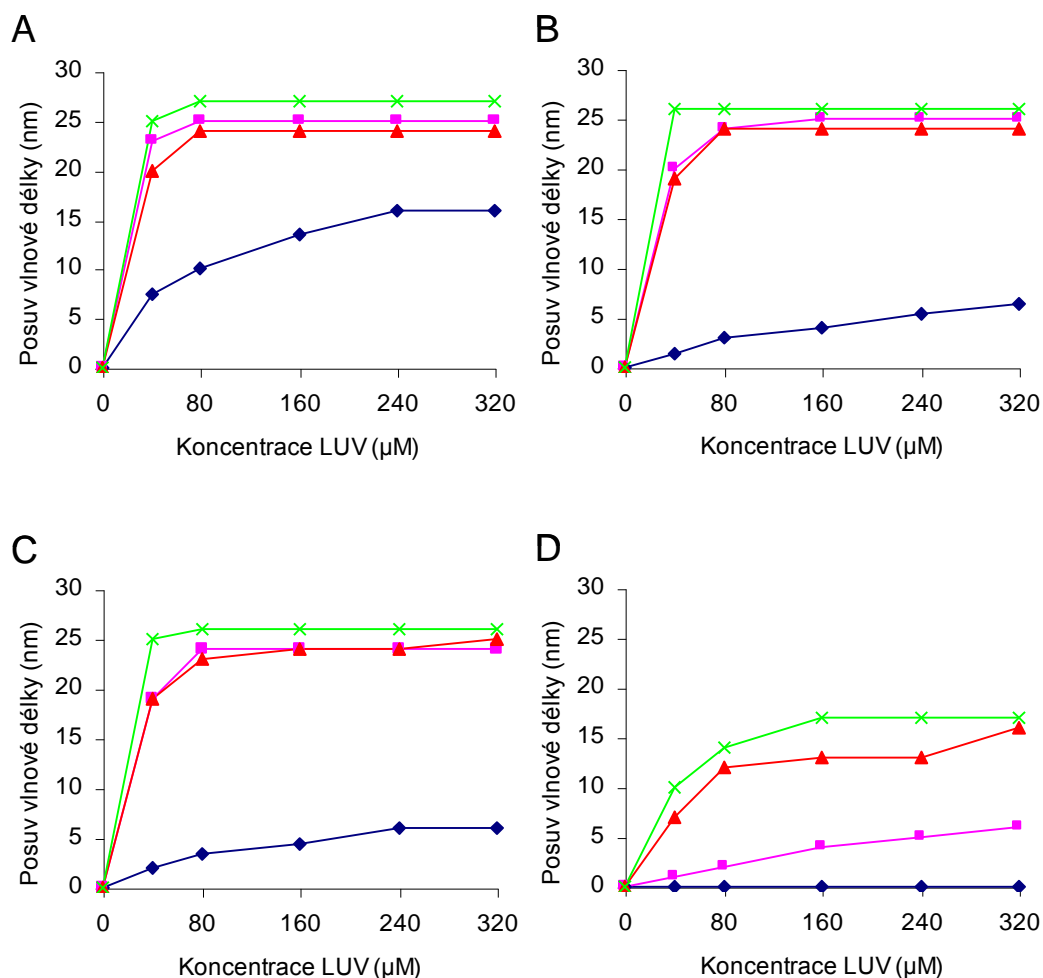
Tabulka 4: Halictiny zvolené pro studium interakce s membránami a jejich biologické aktivity.

Sekvence		Antimikrobiální aktivita MIC [μM]				Hemolýza LC ₅₀ [μM]
		<i>B.s.</i>	<i>E.c.</i>	<i>S.a.</i>	<i>P.a.</i>	
HAL-1	GMWSKILGHLIR-NH ₂	0.8	3.8	7.7	45	82
HAL-1/10	GMWKKILGKLIR-NH ₂	0.8	2.3	15	13	>200
HAL-1/23	GMWKKILGKLIR-NH ₂	0.8	2.7	50	23	>200
HAL-1/13	KMWSKKLGHILIR-NH ₂	50	100	>100	>100	>200

Změny v sekvenci oproti přírodnímu peptidu HAL-1 jsou znázorněny **tučně**, D-aminokyseliny jsou znázorněny *kurzívou*

Rozdílné chování bylo zaznamenáno v případě peptidu HAL-1/13 (Obr. 8 D), který nevykazuje antimikrobiální aktivitu. Jeho interakce s lipozómy je výrazně nižší než u aktivních peptidů. Posuv maxim pro HAL-1/13 je při zvyšující se koncentraci LUV pozvolnější a zvyšuje se s rostoucí koncentrací CL. Také v tomto případě nejvyšší obsah CL v membráně (25 %) způsobuje největší posuv.

Výsledky sledování fluorescence Trp HAL-1 a jeho analogů v přítomnosti vezikul korespondují s antimikrobiální aktivitou. Korelace je taky zřejmá při porovnání hemolytické aktivity peptidů a jejich interakce se zwitteriontovými lipozómy, které napodobují eukaryotní buněčnou membránu (Obr. 8, modrá křivka). Největší posuv (16 nm) vykazoval HAL-1 s výraznou hemolytickou aktivitou (LC₅₀ = 82 μM). Maxima emisního spektra se v případě málo hemolytických analogů HAL-1/10 a HAL-1/23 (LC₅₀ > 200) posunuly výrazně méně (6,0 resp. 6,5 nm) a v případě HAL-1/13 (LC₅₀ > 200) se maximum vůbec nezměnilo.

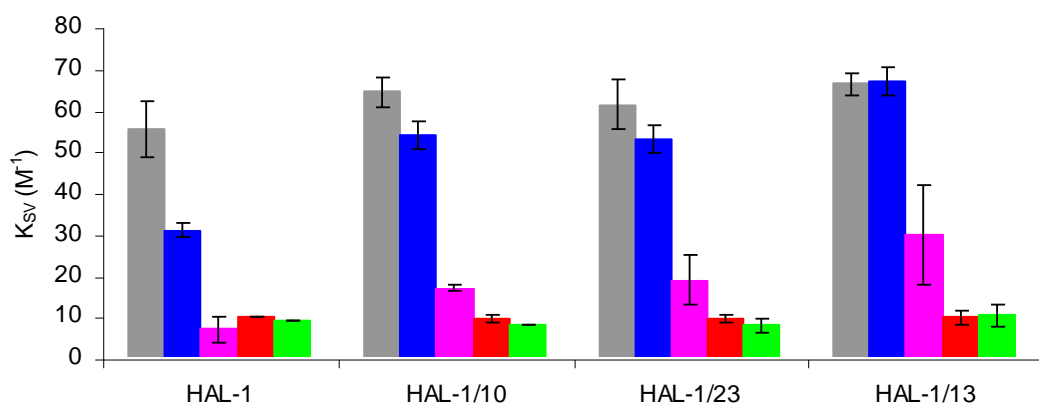


Obrázek 8: Závislost posuvu maxim emisního spektra fluorescence tryptofanu v halictinech. HAL-1 (A), HAL-1/10 (B), HAL-1/23 (C), HAL-1/13 (D) na koncentraci LUV o různém složení: PC:Chol (9:1) tmavě modrá, PE:PG (7:3) růžová, PE:PG:CL (1,5:8:0,5) červená a PE:PG:CL (1,5:6:2,5) zelená.

Přirozenou fluorescence Trp, respektive zhášení této fluorescence, jsme využili také v druhé části studie interakce peptidů s umělými membránami. Fluorescence Trp ve vodním prostředí je zhášena akrylamidem, který je rozpustný ve vodě. Je-li však Trp zanořen do hydrofobní membránové dvouvrstvy, akrylamid k němu nepronikne a nemůže zhášet jeho fluorescence. Tímto způsobem lze odvodit hloubku zanoření do membrány té části sekvence peptidu, která obsahuje Trp. Změny v intenzitě fluorescence Trp byly vyhodnoceny jako Stern-Volmerovy konstanty (K_{SV}) a jsou znázorněny v Obr. 9. Nízké hodnoty K_{SV} značí malou změnu v intenzitě fluorescence a tedy omezený přístup akrylamidu k Trp.

Hodnoty K_{SV} pro HAL-1 i jeho analoga v nepřítomnosti LUV jsou srovnatelné, což ukazuje na skutečnost, že vlivem změny sekvence nedošlo k výrazné změně sekundární

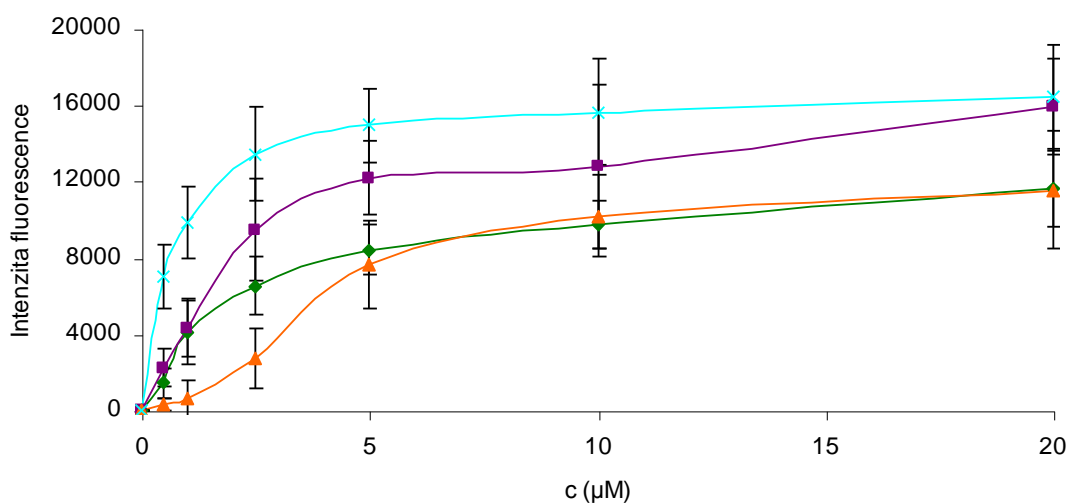
struktury, která by mohla změnit (např. sterickým bráněním) přístup akrylamidu k Trp. Pro peptidy s antimikrobiální aktivitou platí, že v přítomnosti anionických vezikul došlo k výraznému snížení hodnot K_{SV} a v případě HAL-1/10, HAL-1/23 došlo k většímu snížení v přítomnosti LUV obsahující CL. K zhášení v omezené míře došlo také v případě neaktivního analogu HAL-1/13, kdy se K_{SV} snížilo v případě LUV bez CL asi na polovinu, ale v přítomnosti LUV s CL bylo snížení ještě výraznější. Toto pozorování napovídá, že i neaktivní peptid se vnořuje do hydrofobní části membrány. Zhášení fluorescence akrylamidem v přítomnosti zwitteriontových vezikul je ve shodě s hemolytickou aktivitou studovaných peptidů. K výraznějšímu snížení hodnot K_{SV} v přítomnosti zwitteriontových vezikul došlo jen v případě HAL-1, který narozdíl od ostatních vykazuje hemolytickou aktivitu (Obr. 9).



Obrázek 9: Graf znázorňující Ster-Volmerovy konstanty zhášení fluorescence Trp akrylamidem bez přítomnosti LUV šedá, v přítomnosti LUV PC:Chol (9:1) modrá, PE:PG (7:3) růžová, PE:PG:CL (1,5:8:0,5) červená a PE:PG:CL (1,5:6:2,5) zelená.

V závěru této studie jsme pozorovali vliv HAL-1 a jeho tří analogů na propustnost vnější a vnitřní membrány Gram-negativní bakterie *E.c.* Propustnost vnější membrány byla testována pomocí fluorescenční sondy 1-*N*-fenylnafty laminu (NPN), která vykazuje mnohem silnější fluorescenci v hydrofobním prostředí než ve vodném prostředí. Nárůst fluorescence byl pro všechny peptidy tak rychlý, že nešlo zaznamenat jeho nárůst v závislosti na čase a zůstal po celou dobu měření konstantní. Nárůst fluorescence byl ovšem závislý na koncentraci peptidu, jehož záznam po 10min inkubaci bakterií s peptidy znázorňuje Obr. 10. Výrazný růst intenzity fluorescence byl pozorován do koncentrace 5 μM a při zvyšující se koncentraci peptidu se intenzita fluorescence měnila už jen nevýrazně. Největší rozdíly mezi účinky jednotlivých peptidů jsou vidět při jejich nízkých koncentracích. Prudší nárůst fluorescence

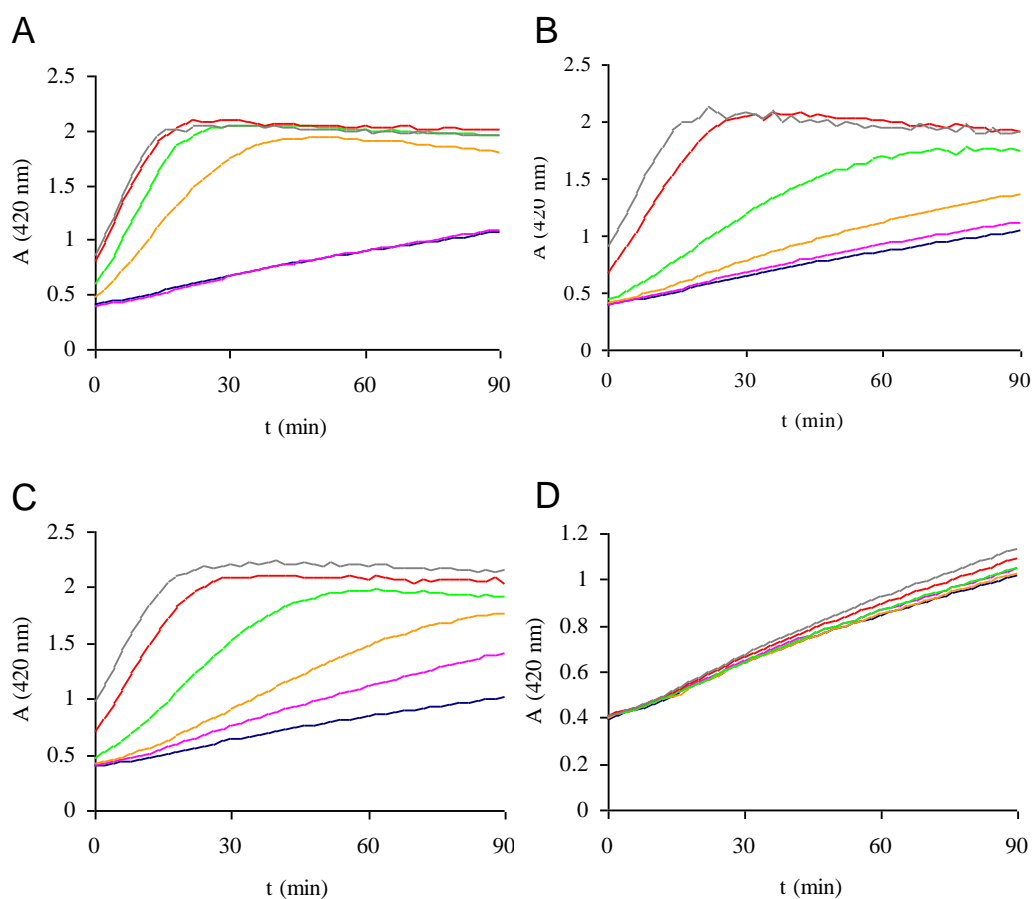
NPN se zvyšujícími se koncentracemi peptidů HAL-1/10 a HAL-1/23 oproti HAL-1 odráží poněkud vyšší antimikrobiální účinnost proti *E.c.* (Tabulka 4). Nejmněší nárůst ukázal HAL-1/13, který nevykazuje proti *E.c.* antimikrobiální aktivitu.



Obrázek 10: Studium vlivu koncentrace halictinů na propustnost vnější membrány *E.c.* Intenzita fluorescence NPN po působení různých koncentrací peptidů po 10min inkubaci: HAL-1 tmavě zelená, HAL-1/10 fialová, HAL-1/23 světle modrá, HAL-1/13 oranžová křivka.

Pro sledování narušení vnitřní membrány buněk *E.c.* peptidy byl použit test využívající β -galaktosidasovou aktivitu. Enzym β -galaktosidasa, nacházející se v cytoplazmě, katalyzuje po uvolnění z cytoplazmy rozklad *o*-nitrofenyl- β -D-galactopyranosidu (ONPG) a vznikající žlutý *o*-nitrofenol může být monitorován spektrofotometricky. Peptidy HAL-1, HAL-1/10 a HAL-1/23 dosahují maxima svého působení v koncentraci 5 μ M (Obr. 11A, B, C), stejně jako při měření propustnosti vnější membrány, a tedy v koncentracích podobných jejich hodnotám MIC (Tabulka 4). HAL-1/13 nevyvolal žádný enzymatický rozklad ONPG (Obr. 11D), z čehož usuzujeme, že nenarušuje vnitřní membránu *E.c.*

Z výsledků studie HAL-1 a jeho analogů s LUV vyplývá, že metoda využívající uměle vytvořené membrány ve formě jednovrstevných vezikul je vhodná pro studium mechanismu účinku AMP. Dále jsme potvrdili, že halictiny na bakterie působí narušením jejich cytoplasmatické membrány. Do membrány jsou schopné se zanořovat i neaktivní analogy AMP, ale tyto peptidy membránu dále nerozruší. V případě Gram-negativních bakterií dochází k úmrtí bakterie peptidem pouze pokud jsou narušeny obě její membrány.



Obrázek 11: Studium vlivu peptidů na propustnost vnitřní membrány buněk *E.c.* Časová závislost absorbance *o*-nitrofenolu vzniklého hydrolyzou ONPG enzymem β -galaktosidasou v přítomnosti peptidů: HAL-1 (A), HAL-1/10 (B), HAL-1/23 (C), HAL-1/13 (D). Koncentrace peptidů je následující: 0 μ M modře, 1 μ M růžově, 2,5 μ M oranžově, 5 μ M zeleně, 10 μ M červeně, 20 μ M šedě.

4.2. Lasiocepsin

První část výsledků této kapitoly byla publikována v časopise Amino Acids (Příloha 2): Monincová, L., Slaninová, J., Fučík, V., Hovorka, O., Voburka, Z., Bednářová, L., Maloň, P., Štokrová, J., & Čeřovský, V. (2012). Lasiocepsin, a novel cyclic antimicrobial peptide from the venom of eusocial bee *Lasioglossum laticeps* (Hymenoptera: Halictidae). *Amino Acids*, 43(2), 751-761.

Podíl autorky dizertační práce na této publikaci je asi 70 %: izolace, určení disulfidických můstků, optimalizace syntézy, syntéza, MS, alkylace –SH skupin cysteinu, vyhodnocení experimentálních dat, podíl na sepsání a revizi publikace.

Druhá část výsledků je publikovaná v časopise ChemBioChem (Příloha 3): Monincová, L., Buděšínský, M., Čujová, S., Čeřovský, V., & Veverka, V. (2014). Structural basis for antimicrobial activity of lasiocepsin. *ChemBioChem*, 15(2), 301-308.

Podíl autorky dizertační práce na této publikaci je asi 50 %: syntéza, MS, příprava lipozómů, fluorescenční měření, propustnost vnější a vnitřní membrány bakterie *E.c.*, vyhodnocení experimentálních dat, podíl na sepsání a revizi publikace.

4.2.1. Charakterizace lasiocepsinu a jeho strukturně-aktivitní studie

V jedu včely ploskočelky velkohlavé (*Lasioglossum laticeps*) jsem vedle již dříve izolovaných lineárních α -helikálních lasioglossinů¹³⁴ nalezla nový AMP. Peptid jsem izolovala pomocí HPLC. Edmanovým odbouráváním, MS a trypsinovým štěpením byla určena jeho sekvence jako GLPRKILCAIAKKKGKCKGPLKLVCKC s dvěma disulfidickými můstky mezi Cys8-Cys25 a Cys17-Cys27. Jeho C-koncový Cys není amidován. Peptid jsme pojmenovali jako lasiocepsin (Las). Tento cyklický kationický AMP je díky své sekvenci a struktuře značně ojedinělý mezi ostatními AMP izolovanými z jedu blanokřídlého hmyzu.

Pro další výzkum byl peptid připraven syntézou na pevné fázi. První přístup syntézy spočíval v jednokrokové oxidaci plně ochráněného lineárního lasiocepsinu vzduchem. Takto ovšem, kromě žádaného produktu, vznikaly navíc další dva analogy s nesprávným spojením disulfidických můstků a tak se značně snižoval výtěžek požadovaného Las. Proto byla optimalizována druhá metoda se selektivní tvorbou disulfidických můstků. V prvním kroku vznikl oxidací vzduchem první disulfidický můstek pouze mezi dvěma nechráněnými cysteiny Cys17 a Cys27. Druhý můstek (Cys8-Cys25) vznikl reakcí katalyzovanou I₂, při které došlo k

odstranění chránících skupin zbylých dvou cysteinů a jejich následné oxidaci (podrobně popsáno v Příloze 2).

Las vykazuje antimikrobiální aktivitu jak proti Gram-pozitivním a Gram-negativním bakteriím, tak také proti kvasinkám *C.a.*, a naopak nevykazuje žádnou hemolytickou aktivitu. Studium struktury pomocí CD bylo zjištěno, že Las obsahuje na rozdíl od lineárních α -helikálních peptidů značný obsah α -helixu (35 %) i ve vodě bez přidaných látek napomáhajících vzniku uspořádanějších struktur. Obsah α -helixu se v přítomnosti TFE zvýší na 52 %.

Význam disulfidických můstků pro strukturu a antimikrobiální aktivitu byl studován s využitím analogu Las s nesprávně propojenými Cys (Las[C8-C27, C17-C25]), s jedním disulfidickým můstkem Las[C8-C25, Ala17,27] a Las[C17-C27, Ala8,25], lineárního analogu Las[Ala8,17,25,27]), u kterých byl Cys nahrazeny Ala, a zkrácených analogů (Příloha 2, Table 1).

Vysoký obsah α -helixu (71 %) v přítomnosti TFE byl pozorován u zkráceného analogu obsahujícího prvních 14 aminokyselin ze sekvence Las (Las[des15-27,Ala8]-NH₂). Tento fakt souhlasí s předpovězenou sekundární strukturou pomocí programu Protein Structure Prediction Server (PSIPRED), který určil α -helikální konformaci sekvence mezi 3.-13. aminokyselinou.

Analogy bez disulfidické vazby nebo jen s jednou vazbou mají ve vodě oproti Las mnohem menší zastoupení α -helixu a velký podíl β -struktury. V přítomnosti TFE β -struktura téměř vymizí a naopak se zvýší podíl α -struktury. Obsah α -helixu dosahuje hodnot jako v přírodním Las pouze v případě analogu Las[C8-C25, Ala17,27] a špatně propojeného Las[C8-C27, C17-C25] (Příloha 2, Table 2). Tyto dva peptidy si taky na rozdíl od ostatních zachovaly určitý stupeň antimikrobiální aktivity (Příloha 2, Table 3, Fig. 4).

Lineární forma Las, jehož -SH skupiny Cys byly chráněné před jejich oxidací alkylací, a lineární analog s Ala na místě Cys (Las[Ala8,17,25,27]) nebyly aktivní proti *M.l.* Lineární lasiocepsin s ponechanými volnými -SH skupinami však aktivitu proti *M.l.* vykazoval. Ztráta aktivity prvních dvou lineárních analogů lze vysvětlit jejich substitucí, která kromě zabránění vzniku disulfidických vazeb také pozměnila jeho prostorovou strukturu a další vlastnosti peptidu. V případě lineárního Las lze zachování antimikrobiální aktivity vysvětlit tím, že mohlo dojít k samovolné oxidaci za vzniku disulfidických vazeb v průběhu testování jeho antimikrobiální aktivity. V následujícím testu jsme proto do media přidali redukční činidlo DTT, které mělo této samovolné oxidaci zabránit. Za těchto podmínek zůstal peptid opravdu lineární (dokázáno HPLC analýzou, Příloha 2, Fig. 5) a stále vykazoval antimikrobiální

aktivitu, i když nedosahoval takové účinnosti jako cyklický Las. Z výsledků stanovování antimikrobiálních aktivit a sekundární struktury analogů můžeme usuzovat, že samotné disulfidické můstky nejsou důležité pro antimikrobiální aktivitu, ale jsou důležité pro dosažení optimální sekundární struktury, ve které je Las schopen působit na bakterii. Lineární peptid v přítomnosti membrány se sice dokáže částečně uspořádat do struktury nutné pro jeho aktivitu, ale nejspíše ne do takové míry, aby dosáhl optimální konformace. Struktura stabilizovaná disulfidickými můstky může být navíc důležitá pro stabilitu peptidu a odolnosti peptidu proti proteasam.

Přímé působení Las na změnu morfologie bakteriální buňky jsme pozorovali transmisní elektronovou mikroskopií (TEM) bakterie *B.s.* před a po inkubaci s Las. Inkubace bakterií s Las po dobu 60-ti minut vedla ke značnému narušení membrány především na pólech bakterie. Těmito místy docházelo k úniku obsahu bakterie. Toto pozorování lze vysvětlit nerovnoměrným rozložením různých druhů fosfolipidů, např. výskytem tzv. raftů, v membráně bakterií¹⁸. Je známo, že *B.s.* má na pólech buňky vyšší obsah záporně nabitého CL na rozdíl od ostatních částí buňky¹⁸. Kumulovaný CL může zvyšovat afinitu Las právě pro toto místo. Následující studií interakce lasiocepsinu s umělými membránami pomocí fluorescence Trp jsme zjišťovali, zdali je CL klíčovým fosfolipidem pro jeho účinek.

4.2.2. Strukturní základy pro antimikrobiální aktivitu lasiocepsinu

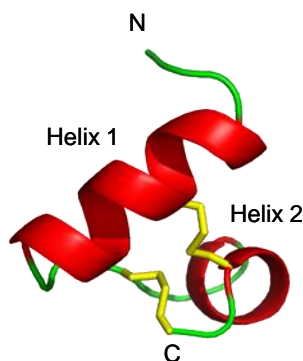
V této studii (Příloha 3) jsme se zaměřili na prohloubení znalosti o prostorové struktuře a způsobu účinku Las na membránu. Na základě NMR měření jsme zjistili, že Las vytváří dobře definovanou strukturu, která je stabilizovaná dvěma disulfidickými můstky a obsahuje dva α -helikální úseky spojené smyčkou (Obr. 12). Helixy jsou uspořádány navzájem téměř kolmo. Výsledky z NMR měření jsou ve shodě s výsledky získanými na základě CD uvedenými v Příloze 2.

Molekula Las vytváří amfipatickou strukturu, která obsahuje devět kladně nabitých aminokyselin, které tvoří poměrně veliký povrch (až 53 %) a jsou rozděleny do dvou samostatných úseků. Většina hydrofobních aminokyselin, které vytvářejí nepolární povrch molekuly, alespoň částečně směřuje ven z molekuly do rozpouštědla. Velikost Las není dostatečná pro vytvoření hydrofobního jádra.

Las má podle databáze Protein Data Bank značnou strukturní shodu s polypeptidy ze skupiny AMP nebo toxinů patřících do ShK rodiny, které sdílejí stejný motiv zvaný ShK^{147,148,149,150}. Las ale na rozdíl od výše zmíněných polypeptidů obsahuje o jeden disulfid méně. Podle strukturní shody Las s toxiny se jeví antimikrobiální aktivita jako aktivita

vedlejší doprovázející jinou hlavní roli peptidu. Ta nejspíše bude spočívat v neurotoxickém účinku.

Ve studiu interakce Las s umělými membránami jsme využili fluorescence Trp. V Las není Trp přirozeně zastoupen, proto jsme připravili dva analogy obsahující Trp na začátku sekvence Las[Trp2] a na konci sekvence Las[Trp23] (Příloha 3, Table 1). Umístění Trp bylo voleno tak, aby se analogy lišily co nejméně svými vlastnostmi od původního peptidu. Správnost volby nám potvrdilo stanovení antimikrobiální a hemolytické aktivity, které byly záměnami ovlivněny pouze nepatrně (Příloha 3, Table 3).



Obrázek 12: Struktura Las získaná na základě $2D^{15}N/^1H$ HSQC spekter.

Červeně jsou znázorněny α -helikální úseky, žlutě disulfidické můstky.

Měření probíhalo v přítomnosti zwitterioiontových a anionických LUV (Příloha 3, Fig. 4), které byly také použity pro studium halictinů. Protože ani jeden z analogů Las neměl hemolytickou aktivitu, podle očekávání jsme v přítomnosti zwitterioiontových vezikulí (PC:Chol (9:1)) nepozorovali žádný posuv fluorescenčního maxima Trp. Tedy nedošlo k vnoření peptidu do hydrofobního prostředí membrány. Naopak výrazné posuvy ve spektru se ukázaly při interakci peptidů s anionickými lipozómy (PE:PG (7:3), PE:PG:CL (1,5:8:0,5) a PE:PG:CL (1,5:6:2,5)). Při nejvyšších koncentracích LUV (320 μ M) bylo dosaženo stejného maximálního posuvu pro všechny druhy anionických vezikulí. Výjimku tvoří spektra Las[Trp23] v přítomnosti vezikulí složených z PE:PG (7:3), které napodobují membránu *E.c.* V tomto případě je menší posuv v souladu s dvakrát nižší antimikrobiální aktivitou proti této bakterii ve srovnání s aktivitou pro Las[Trp2]. Rozdíl v interakci je zřejmý při nižších koncentracích LUV, kdy k nejrychlejšímu nárůstu posuvu došlo v přítomnosti vezikulí obsahujících největší podíl CL. Naopak nejpomalejší nárůst byl v přítomnosti LUV bez CL. Toto pozorování je shodné s výsledky fluorescenční studie HAL-1 a jeho analogů v kapitole 4.1. Tím byla potvrzena domněnka získaná pozorováním z TEM, že vyšší koncentrace CL v membráně na pólech bakterie *B.s.* zvyšuje schopnost Las rozrušit bakteriální membránu především v těchto místech.

V dalším kroku studie mechanismu účinku Las jsme se zaměřili na vliv peptidu na propustnost vnější a vnitřní membrány bakterie *E.c.* Pro experimenty jsme použili Las i oba analogy obsahující Trp. Všechny tři peptidy měly podobný průběh chování. Tak jako podobná antimikrobiální a hemolytická aktivita všech tří zkoumaných peptidů, tak i podobný průběh narušování membrán buněk *E.c.* nám potvrzuje, že analogy záměnou daných aminokyselin za Trp nebyly výrazně ovlivněny. Tyto analogy jsou tedy vhodné i pro následující studium interakce s modely membrán, kde přírodní Las nemůže být aplikován z důvodů absence Trp v sekvenci. Narušení vnější membrány *E.c.* peptidy bylo detekováno jako nárůst fluorescence hydrofobní fluorescenční sondy NPN. Nárůst intenzity byl závislý na koncentraci peptidu a byl největší při koncentraci 2,5 μM (Příloha 3, Fig. 5), která odpovídá hodnotám MIC peptidů. Při další zvyšující se koncentraci byl nárůst už jen pozvolný. V případě narušení vnitřní membrány, které bylo měřeno jako nárůst absorpance *o*-nitrofenolu, produktu hydrolýzy ONPG cytosolickou β -galaktosidasou, došlo k zaznamenání aktivity již při koncentraci 1 μM . (Příloha 3, Fig. 6), tedy pod hodnotou MIC (Příloha 3, Table 3).

Na závěr jsme se pokusili určit, která část molekuly Las je zodpovědná za interakci s membránou. Studie založená na základě měření NMR spekter peptidu v přítomnosti anionických micel SDS ukázaly ovlivnění aminokyselin nacházejících se v helixu 1 (viz Obr. 12) na straně, která je vystavená rozpouštědлу (především Arg4, Ala9, Ala11, Lys13). Zároveň jsme využili zhášení fluorescence Trp akrylamidem pro analogy obsahující Trp v přítomnosti lipozómů. Výsledky jsou shrnuty jako hodnoty K_{SV} v Fig. 8, Příloha 3. Přítomnost anionických vezikulí podle očekávání značně ovlivnila hodnoty K_{SV} , které jsou významně nižší než v případě měření bez vezikulí. Protože dochází ke snížení zhášení pro oba dva peptidy, tedy jsou zhášeny Trp nacházející se na rozdílných koncích molekuly, lze usoudit, že peptid se zanořuje do dvouvrstvy membrány oběma konci. Hlubší zanoření lze pozorovat do záporně nabitých membrán obsahujících CL, které lze vyčíst z nižších hodnot K_{SV} a které nám potvrzují, že přítomnost CL ulehčuje vniknutí peptidu do membrány. Zdá se, že za počáteční interakce s negativně nabitou membránou je zodpovědná N-koncová část Las. Ovšem hluboko do dvouvrstvy membrány se zanořuje jak N-koncová, tak C-koncová část peptidu.

4.3. Macropin

Výsledky jsou publikovány v časopise Journal of Peptide Science (Příloha 4): Monincová, L., Veverka, V., Slaninová, J., Buděšínský, M., Fučík, V., Bednářová, L., Straka, J., & Čerovský, V. (2014). Structure-activity study of macropin, a novel antimicrobial peptide from the venom of solitary *Macropis fulvipes* (Hymenoptera: Melittidae). *Journal of Peptide Science*. 20(6), 375-384.

Podíl autorky dizertace na této publikaci je asi 50 %: izolace, MS, syntéza, stabilita peptidů v séru, vyhodnocení experimentálních dat, podíl na sepsání a revizi publikace.

Macropin (MAC-1) jsem izolovala z jedu soliterní včely olejnice žlutohnědé (*Macropis fulvipes*) a jeho sekvenci jsme určili jako GFGMALKLLKKVL-NH₂. MAC-1 má jen mírnou hemolytickou aktivitu, ale vysokou aktivitu proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím a také proti kvasinkám *C.a.* (Příloha 4, Table 2.). Na základě změřených CD spekter vytváří MAC-1 v přítomnosti 30% TFE strukturu obsahující 43 % α -helixu (Příloha 4, Table 4.) a v Edmunsově projekci vykazuje amfipatické uspořádání (Příloha 4, Fig. 2). Tento peptid lze tedy zařadit do skupiny lineárních α -helikálních kationických AMP.

Převážná část mé práce byla věnována studiu vlivu struktury na aktivitu (SAR) a zvýšení stability v lidském séru. Připravené analogy podle druhu substituce můžeme rozdělit do tří skupin. V první skupině je zahrnuta enantiomerní forma macropinu, analog s obrácenou sekvencí a od něho odvozený enantiomer. Do druhé skupiny jsou zařazeny analogy, kde byly vybrané L-aminokyseliny zaměněny jinými L-aminokyselinami za účelem změny jejich kationicity a hydrofobicity, ale zároveň bez ovlivnění α -helicity. Třetí skupina obsahuje analogy, kde bylo postupně všech 11 L-aminokyselin zaměněno za D-aminokyseliny.

Z první skupiny analogů stojí za zmínku enantiomerní forma MAC (MAC-1/1). Tento analog stejně jako v případě halictinů vykazuje srovnatelné biologické aktivity s původním přírodním peptidem.

V druhé sérii analogů jsme např. pro zvýšení hydrofobicity zaměnili postupně Leu v pozici 9, 8 nebo 6 (MAC-1/24, MAC-1/25, MAC-1/26) za hydrofobnější 1-aminocyklohexanocarboxylovou kyselinu (Aca) s objemnou postranní skupinou. V tomto případě se až dvakrát vylepšila aktivita proti *P.a.*, ale zároveň se dvakrát zhoršila hemolytická aktivita. Zvýšení kladného náboje MAC-1 jsme docílili substitucí Gly3 za Lys (MAC-1/9) a Met4 za Lys (MAC-1/31). V obou dvou případech vedla změna ke značnému vylepšení aktivity proti *P.a.*, ale zároveň ke snížení aktivity proti *S.a.* Významná je ztráta hemolytické aktivity v případě analogu HAL-1/31. Především pro studium stability peptidu v krevním séru

byl vytvořen analog se záměnou všech tří Lys za kratší homolog Orn. Tato substituce vedla ke snížení jak antimikrobiální tak hemolytické aktivity.

Z výsledků třetí skupiny analogů lze vyčíst souvislost mezi biologickou aktivitou a obsahem α -helikální struktury. Substitucí L-aminokyseliny v pozici přibližující se k C-konci za D-aminokyselinu dochází k narušování α -helikální struktury, snižování jejího celkového obsahu a zároveň ke zhoršování antimikrobiální aktivity (Příloha 4, Supplementary material, Table 1).

Modifikacemi jsme se snažili, kromě ovlivnění antimikrobiální či hemolytické aktivity, také zvýšit stabilitu peptidů v krevním séru. Nízká stabilita AMP a jejich rychlý rozklad proteasami v tělních tekutinách patří mezi hlavní problémy při využití peptidů v praxi. Zvýšenou stabilitu ukázal enantiomerní analog (MAC-1/1), jehož předností bylo zachování biologických aktivit srovnatelných s MAC-1 (Příloha 4, Table 3). Příprava peptidu pouze z D-aminokyselin je ovšem poměrně nákladná. Pro snížení ceny syntézy jsme se rozhodli zaměnit pouze ty aminokyseliny v řetězci, jejichž vazby jsou náchylné ke štěpení a to buď za D-aminokyseliny nebo za neproteinogenní aminokyseliny. Z analýzy štěpených míst v přírodním peptidu MAC-1 se ukázalo, že štěpení probíhá postupně na mnoha vazbách v peptidu, avšak nejrychleji jsou štěpeny vazby na N-konci sekvence aminopeptidasami obsaženými v séru. Záměnou L-aminokyselin za D-aminokyseliny v blízkosti N-konce jsme získali analogy se zvýšenou stabilitou, a jejichž antimikrobiální aktivita zůstala zachovaná nebo byla dokonce zvýšená (MAC-1/6, MAC-1/28, MAC-1/29). Bohužel ani u jednoho analogu nedošlo k snížení nežádoucí hemolytické aktivity. Překvapivě v případě analogů s D-Lys na pozici 3 (MAC-1/10 a MAC-1/30) byla zjištěna snížená stabilita v séru. Pravděpodobně se touto substitucí jedna z peptidových vazeb na N-konci peptidu dostala do pozice, ve které je protease lépe dostupná. U analogu MAC-1/20 se všemi Lys vyměněnými za Orn došlo překvapivě ke zhoršení jak stability, tak antimikrobiální aktivity.

Pomocí NMR jsme podrobněji zkoumali strukturu MAC-1 a vybraných analogů s D-aminokyselinou v sekvenci. Směs TFE/H₂O se často používá pro stabilizaci α -helixu v peptidech, které netvoří helikální strukturu ve vodě. Negativně nabitě SDS micely také vyvolávají u AMP vznik uspořádané struktury, ale jiným mechanismem než TFE. Tomu odpovídají lišící se struktury peptidu získané NMR v různém prostředí (Příloha 4, Fig. 4, 5). MAC-1 v přítomnosti 30% TFE vytváří α -helix po celé délce peptidu (Příloha 4, Fig. 4A), zatímco v přítomnosti 100 mM SDS zůstává N-terminální část rozvolněná a α -helix se tvoří jen v C-koncové části (Leu6-Leu13). Zde je tvorba podpořena interakcí tří Lys s negativním povrchem SDS micel a vodíkovou vazbou mezi Leu13 a Leu9 (Příloha 4, Fig. 5A). Výměna

Gly3 za D-Lys (Mac-1/10) významně nezměnila strukturu oproti MAC-1 ani v přítomnosti TFE ani SDS (Příloha 4, Fig. 4B, 5B). Došlo zde k vylepšení antimikrobiální aktivity vzhledem k MAC-1, ale antimikrobiální aktivita se nezměnila oproti analogu MAC-1/9, kde je Gly3 zaměněn za L-Lys. V tomto případě zvýšení antimikrobiální aktivity nesouvisí se změnou α -helikální struktury, ale se zvýšením kladného náboje peptidu. Ke zvýšení obsahu α -helixu došlo v případě analogu MAC-1/6 s D-Phe2 (Příloha 4, Fig. 5B), ale nedošlo k ovlivnění biologické aktivity. Záměna L-Lys7 za D-Lys (MAC-1/13) vedlo ke zrušení α -helikální struktury v N-koncové oblasti peptidu (Příloha 4, Fig. 5E) a také ke snížení antimikrobiální aktivity. Úplné narušení α -helixu (Příloha 4, Fig. 4D, 5D) vzniklé výměnou L-Lys11 za D-Lys (MAC-1/11) vedlo k výraznému snížení antimikrobiální aktivity. Tyto výsledky korespondují s výsledky z CD měření po porovnání s biologickými aktivitami.

4.4. Defensin z pilořitky olřov 

Nov  nepublikovan  výsledky se zab vaji dosud neposan m antimikrobiálním peptidem, kter  jsme detekovali v ovipozi n m sekretu pilořitky olřov  (*Xyphidria camelus*) z řadu blanokř dl  (Hymenoptera). Pilořitka olřov  je škůdce listnatých dřevin a sv m napaden m oslabených a chřadnoucích strom  způsobuje jejich zánik. Pilořitka klade v j čka pod k ru strom  a vyl hl  larvy vytv rajej  v dřevi rozs hl  chodby¹⁵¹. Ovipozi n  sekret sam ka vypouřt  s kladen m v j čkem a jeho úloha je komplexn . Lze jej považovat za jed, protože bylo dokázáno, že sekret m  v razn  fytotoxick  účinky, kterými napomáhá k lokálnímu odumř n  vodivých pletiv¹⁵². Dále usnadňuje průchod v j čka kladélkem, slouží jako strava pro vyl hl  larvy a má vliv na růst symbiotick  houby. Složení ovipozičního sekretu pilořitek nebylo dosud podrobn  prozkoumáno.

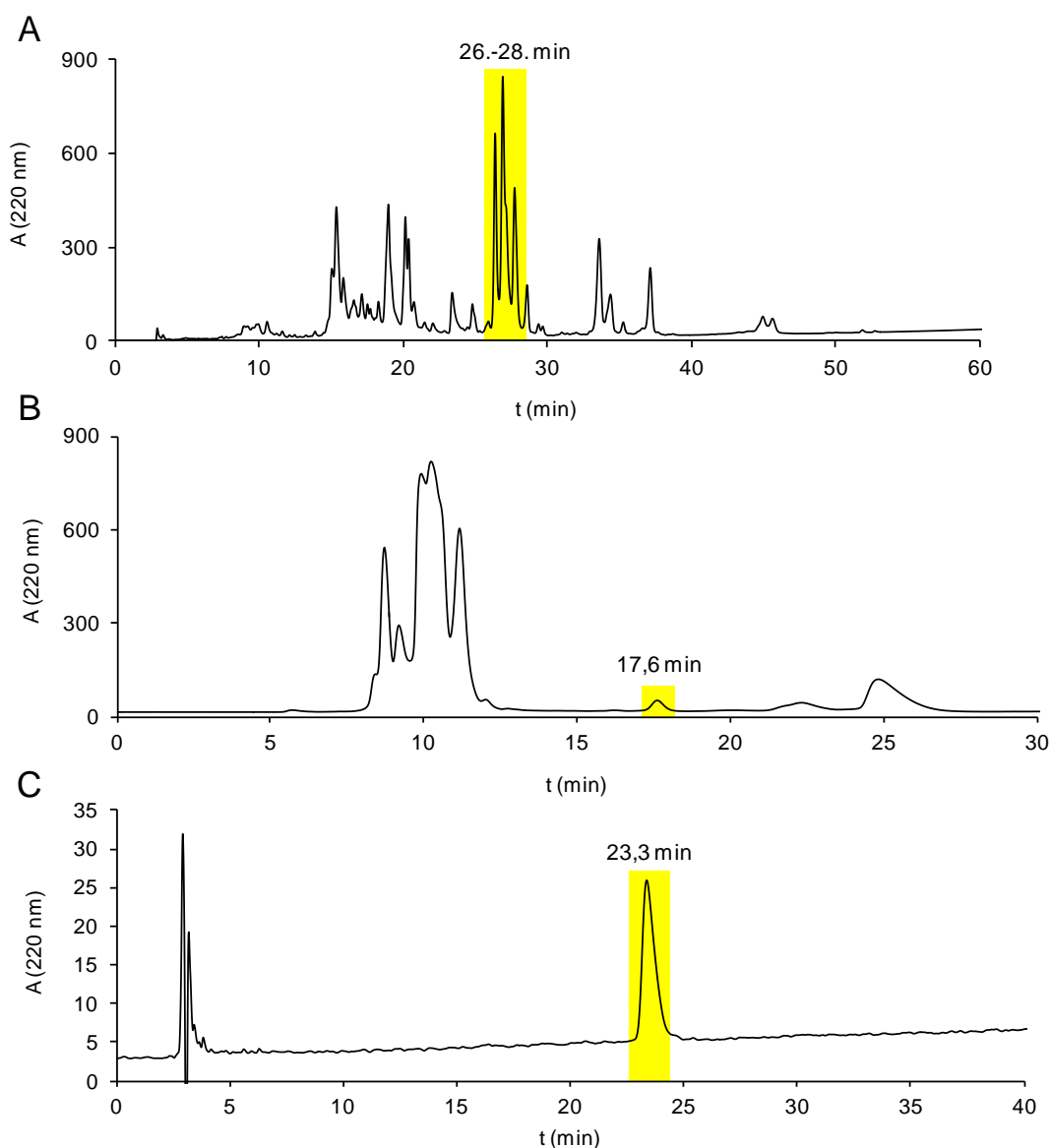
Z 30-ti dospělých samic odchytut ch v jiţn ch Āech ch byl odebrán sekret, kter  byl extrahován směsí ACN/H O (1:1) obsahující 0,5% TFA. Extrakt byl p ed iřt n odstran n m vysokomolekulárních látek ultrafiltrací s membránou 100 kDa. Vznikl  filtrát byl dále zbaven nízkomolekulárních látek ultrafiltrací s membránou 3 kDa. Ze zisk n ho reten tu jsme pomocí RP-HPLC izolovali látky absorbující při 220 nm (Obr. 13A). Antimikrobiální aktivita jednotlivých frakcí byla testována na bakterii *M.l.* Aktivitu vykazovaly frakce v rozmezí retenčních časů 26.-28. min. Tyto frakce byly postupn  zisk ny z několika RP-HPLC izolací, spojeny a dále p e iřt ny vysokoúčinnou gelovou permeační chromatografií (SE-HPLC). Frakce v čase 17,6 min (Obr. 13B), vykazující antimikrobiální aktivitu, byla nakonec p e iřt na opět pomocí RP-HPLC (Obr. 13C). Izolovan  látka byla podrobena řad  analytických kroků pro zisk n   pln  sekvence.

MS jsme stanovili molekulovou hmotnost 5748,817 (Obr. 14A) a Edmanovým odbouráváním jsme ziskali sekvenci 50 aminokyselin:

$$M_{r(1-50)} = 5137,52$$

VTXDLLSLNVKGIEVANSAXAANXLSLGKAGGRXVGSVXQXRKTTFGKLW,

kde X zn zorn je neurčenou aminokyselinu. Jedná se s největř  pravděpodobností o Cys, kter  jsou spojen  do tři disulfidických m stkv . Z tohoto důvodu nelze Cys Edmanovým odbouráváním stanovit. Vypo  itan  molekulov  hmotnost této sekvence 5137,52 neodpovídá zm řen  molekulov  hmotnosti 5748,817 (Obr. 14A) a je zřejm , že se napoprvé nepodařilo zisk t úplnou sekvenci. Přesto v řř  molekulov  hmotnost a sekvence obsahující tři disulfidick  můstky jasn  naznačují, že se jedná o AMP patřící do skupiny hmyzích defensinů.



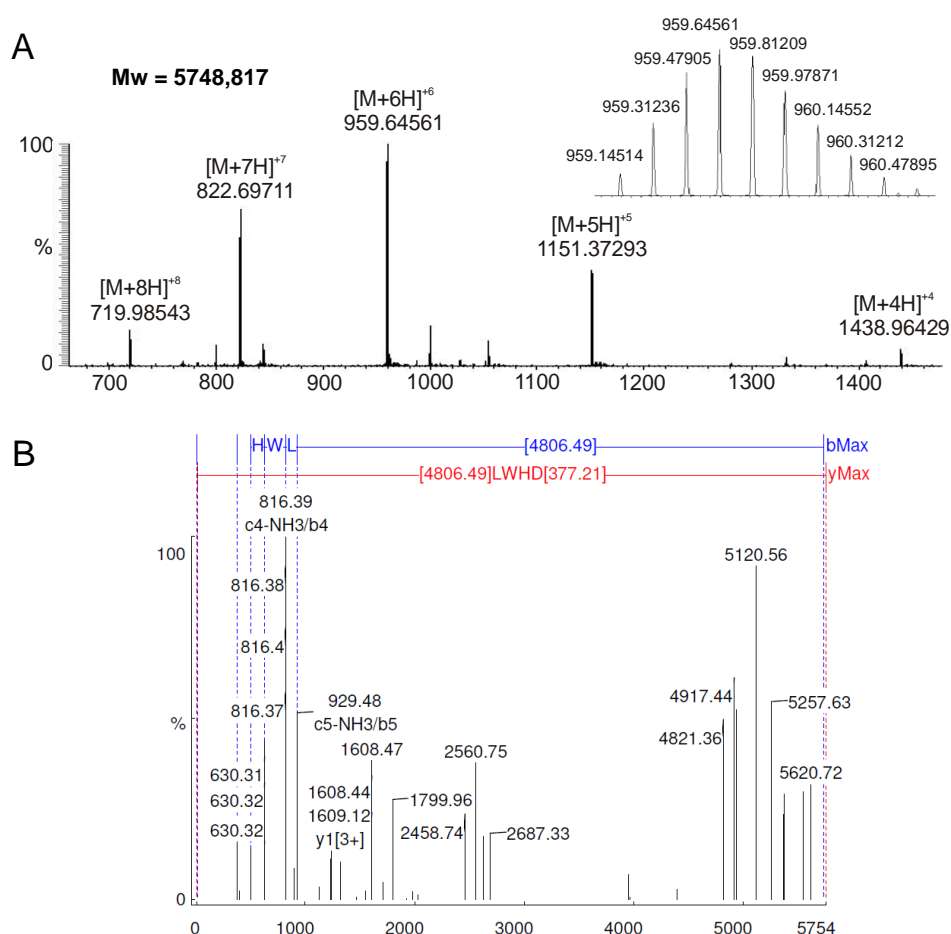
Obrázek 13: HPLC záznamy tří izolačních kroků defensinu ze sekretu pilořitky olšové. RP-HPLC vzorku připraveného ultrafiltrací (100 kDa a 3 kDa). Kolona Vydac C-18, 250 × 4,6 mm, 5 μm, průtoková rychlost 1 ml/min. Gradient: 100 % směsi A (5 % ACN/H₂O s 0,1 % TFA) až 100 % směsi B (70 % ACN/H₂O s 0,1 % TFA) za 60 min, 220 nm (A), SE-HPLC frakce eluované v 26.-28. minutě v předchozím kroku. Kolona Bio-Sil SEC-125, 300 × 7,8 mm, 5 μm, průtoková rychlosti 1 ml/min, mobilní fáze: 0,5 M pufr octanu amonného, pH = 4,4, 220 nm (B), závěrečné čištění frakce z SE-HPLC s t_r = 17,6 min pomocí RP-HPLC. Kolona Vydac C-18, 250 × 4,6 mm; 5 μm (Grace Vydac, USA), průtoková rychlost 1 ml/min. Gradient: 70 % směsi A (5 % ACN/H₂O s 0,1 % TFA) až 50 % směsi B (70 % ACN/H₂O s 0,1 % TFA) za 60 min, 220 nm (C).

Tandemovou hmotnostní spektrometrií jsme získali informaci o dalších dvou aminokyselinách (His a Asp) nacházejících se na C-konci molekuly (Obr. 14B):

$$M_{r(1-52)} = 5389,61$$

VTCDLLSLNVKGIEVANSACAANCLSLGKAGGRXVGSVCQCRKTTFGKLW**HD**.

Teoretická molekulová hmotnost odpovídající peptidu o 52 aminokyselinách 5389,61 však stále neodpovídá změřené molekulové hmotnosti izolovaného peptidu. Tedy ani tandemová hmotnostní spektrometrie nám neposkytla celou sekvenci. Tento experiment jsme provedli s nezredukovaným peptidem, kde kompaktní forma peptidu udržovaná disulfidickými můstky nejspíše bránila fragmentaci peptidu během analýzy tandemovou MS.



Obrázek 14: Záznamy hmotnostních spekter defensinu z pilořitky olšové: MS spektrum s vysokým rozlišením získané na přístroji s analyzátozem Orbitrap s detailem izotopové obálky (A), MS/MS spektrum defensinu z pilořitky olšové získané na přístroji s vysokým rozlišením s analyzátozem Orbitrap. His identifikovaný z fragmentů y a b, Asp identifikovaný z fragmentů y (B).

Na vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometru s elektrostatickou orbitální pastí (Orbitrap) jsme získali přesnou molekulovou hmotnost defensinu 5748,817 (Obr. 14A). Z tak přesné molekulové hmotnosti lze určit zbývající aminokyseliny na základě rozdílu mezi experimentálně zjištěnou hmotou a teoretickou hmotou vypočítanou pro zjištěných 52 aminokyselin. Za pomoci programu MS-Comp (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>) byly navrženy poslední tři aminokyseliny bez určení jejich pořadí buď jako Phe, Gly, Arg v kombinaci s amidovaným C-koncovým karboxylem nebo jako Phe, Ile/Leu, Val v kombinaci s volnou C-koncovou karboxylovou skupinou:

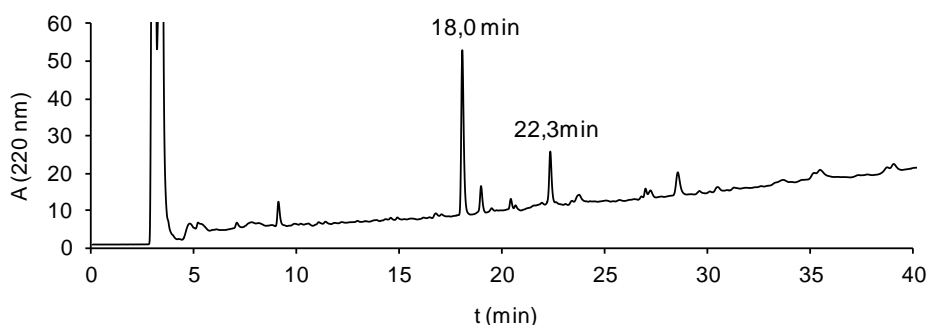
$$M_{r(1-55)}(\text{FGR}) = 5748,81$$



$$M_{r(1-55)}(\text{FVIL}) = 5748,83$$



Ke stanovení kompletní sekvence defensinu jsme nakonec využili enzymatického štěpení pomocí endoproteinasy Lys-C, která štěpí na karboxylové straně Lys. Fragmenty vzniklé štěpením jsme izolovali pomocí RP-HPLC (Obr. 15).



Obrázek 15: RP-HPLC záznam defensinu z pilořitky olšové po štěpení enzymem Lys-C. Kolona Vydac C-18, 250 × 4,6 mm, 5 μm, průtoková rychlost 1 ml/min. Gradient: 70 % směsi A (5 % ACN/H₂O s 0,1 % TFA) až 50 % směsi B (70 % ACN/H₂O s 0,1 % TFA) za 60 min, 220 nm.

Následně jsme izolované štěpy sekvenovali Edmanovým odbouráváním. Edmanovo odbourávání intenzivního píku eluovaného v 18,0 min nám jednoznačně poskytlo sekvenci LWHDRGF, která odpovídá C-koncovému peptidu vzniklého štěpením peptidové vazby Lys48-Leu49. Tím jsme získali kompletní sekvenci nového hmyzího defensinu, která je na C-konci amidována:

$$M_{r(1-55)} = 5748,817$$



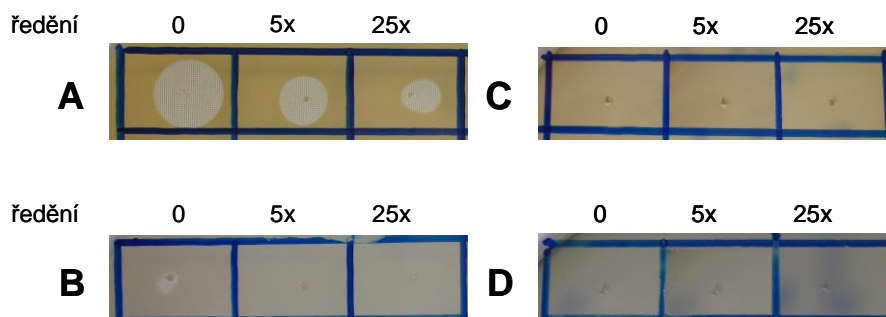
Edmanovým odbouráváním peptidu s retenčním časem 22,3 min (Obr. 15) jsme ověřili již známou sekvenci N-koncové části molekuly. Tato část defensinu se zachovanými disulfidickými můstky byla sice proteinasou Lys-C štěpena v místě Lys11, Lys29 a Lys43, ale díky disulfidickým můstkům peptid zůstal vcelku.

Spojení jednotlivých můstků jsme pro nedostatek materiálu nemohli ověřit. Z literatury je však známo, že hmyzí defensiny mají konzervované propojení disulfidických můstků v pořadí Cys1-Cys4, Cys2-Cys5, Cys3-Cys6. Primární struktura defensinu z pilořítky olšové byla tedy stanovena tak, jak je znázorněno na obrázku 16.



Obrázek 16: Primární struktura defensinu z pilořítky olšové se znázorněnými disulfidickými můstky.

Základní informace o antimikrobiální aktivitě defensinu z pilořítky olšové jsme stanovili kapkovacím testem (Obr. 17). Podobně jako většina hmyzích defensinů i tento defensin vykazuje antimikrobiální aktivitu proti Gram-pozitivním bakteriím *M.l.* a *B.s.*, ale není aktivní proti Gram-negativním bakteriím *E.c.* a *P.a.*



Obrázek 17: Kapkovací test na Petriho miskách pro detekci antimikrobiální aktivity defensinu z pilořítky olšové proti Gram-pozitivní bakterii *M.l.* (A), *B.s.* (B) a Gram-negativní bakterii *E.c.* (C) a *P.a.* (D).

5. Diskuze a závěr

Sekvence nově objevených antimikrobiálních peptidů v jedu volně žijících včel

Jedové váčky hmyzu z řádu hymenoptera se ukázaly jako bohatý zdroj AMP s velkým potenciálem pro terapeutické využití. Pro izolaci a čištění těchto AMP jsme zavedli efektivní a jednoduchý postup využívající RP-HPLC. Jejich sekvence byla stanovena Edmanovým odbouráváním na základě hmotnosti stanovené MS. Lze je snadno syntetizovat a tedy jsou výhodné pro návrh analogů a jejich strukturně-aktivitní studii.

V tabulkách 5 a 6 jsou uvedeny AMP z jedových váček divoce žijících včel, na jejichž objevení jsem se podílela během mého doktorského studia ve skupině Dr. Václava Čerovského. Tyto AMP lze zařadit do dvou skupin.

První skupinu tvoří cyklické AMP (Tabulka 5), které se vyskytují v jedových váčkách jen ojediněle. Období námi objevených cyklických peptidů v jedu blanokřídlého hmyzu nebyly zatím v literatuře popsány.

Tabulka 5: Přehled sekvencí a biologických aktivit nově objevených cyklických AMP v jedu volně žijících včel skupinou Václava Čerovského, ÚOCHB AV ČR, v.v.i.

Název AMP ^{a)}	Sekvence	Antimikrobiální aktivita MIC (μM)					Hemolytická aktivita LC ₅₀ (μM)
		<i>B.s.</i>	<i>E.c.</i>	<i>S.a.</i>	<i>P.a.</i>	<i>C.a.</i>	
Las	GLPRKILCAIAKKKGKCKGPKLVCKC	0,3	5,5	90,0	15,0	4,5	>200
PNG-R	LDVKKIICVACKIKPNPACKKICPK	1,5	32,5	>100	>100	18,7	>200
PNG-K	LDVKKIICVACKIRPNPACKKICPK	3,3	63,3	>100	>100	24,2	>200

^{a)} název peptidu je odvozen od názvu příslušné specíe volně žijící včely: Las, *Lasioglossum laticeps*; PNG-R, PNG-K, *Panurgus calcaratus* ¹⁵³

Druhou skupinu tvoří lineární α -helikální AMP (Tabulka 6), které jsou v jedových váčkách mnohem častější. Na základě sekvencí je dále můžeme rozdělit na dvě podskupiny. První podskupina obsahuje AMP s Pro na pozici 11 (výjimka je NOML s Pro na pozici 12), který, jak se ukázalo, je důležitý pro selektivní působení na bakteriální buňku a vytváří ohyb (tzv. *Pro kink*) α -helikální struktury¹³². V sekvenci lze nalézt i další konzervované pozice aminokyselin a to Ser na pozici 4, kladně nabitě aminokyseliny Lys nebo Arg na pozici 7 a 8. Druhou podskupinu tvoří AMP, které Pro neobsahují, ale často se v jejich sekvenci nachází

Gly, který také narušuje α -helikální strukturu. V pozici 7, 10 a 11 je často Leu nebo Ile a v pozici 12 pak lze často nalézt Lys nebo Arg.

V obou dvou skupinách můžeme najít více či méně společné konzervované pozice aminokyselin a to N-koncový Gly, Leu/Ile nebo Val na pozici 6, bazickou C-koncovou aminokyselinu Arg nebo Lys. C-koncová aminokyselina je ve většině případů amidovaná.

Tabulka 6: Přehled sekvencí a biologických aktivit nově objevených lineárních α -helikálních AMP v jedu volně žijících včel skupinou Václava Čerovského, ÚOCHB AV ČR, v.v.i. v porovnání s jinými antimikrobiálními látkami (anoplin, indolicidin, tetracyklin a clotrimazol)

Název AMP ^{a)}		Sekvence		Antimikrobiální aktivita MIC					Hemol.																	
				(μM)					aktivita																	
				<i>B.s.</i>	<i>E.c.</i>	<i>S.a.</i>	<i>P.a.</i>	<i>C.a.</i>	LC ₅₀ (μM)																	
Pro v sekvenci	Pořadí	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19						
	MEP	G	F	L	S	I	L	K	K	V	L	P	K	V	M	A	H	M	K	-NH ₂	0,8	2,0	6,8	18,5	8,7	>100
	Coe	G	V	W	S	T	L	K	K	L	V	P	A	I	M	Q	H	A	-NH ₂	4,7	6,3	>100	100	40,0	>100	
	NOM	L	F	G	S	M	L	K	K	L	L	P	L	I	K	S	H	L	K	-NH ₂	1,7	2,5	35,0	57,5	9,5	137
	NOMF	G	I	G	G	L	L	K	K	L	L	P	L	I	K	S	Q	I	K		2,7	7,2	100	70,0	13,0	>200
	NOML	G	L	L	A	G	V	M	K	K	L	L	P	M	I	K	S	H	L	K		2,7	2,5	70,0	57,0	10,0
Pro v sekvenci bez	NOMC	G	I	G	G	L	L	K	K	L	M	P	L	I	K	S	Q	I	K		3,6	7,3	>100	77,5	36,9	>>200
	HAL-1	G	M	W	S	K	I	L	G	H	L	I	R	-NH ₂							0,8	3,8	7,7	45,0	6,3	82
	HAL-2	G	K	W	M	S	L	L	K	H	I	L	K	-NH ₂							1,0	2,5	8,1	42,1	6,6	78
	HALS	G	M	W	S	K	V	L	K	H	L	I	K	-NH ₂							3,0	3,5	7,0	16	3,5	>200
	MAC-1	G	F	G	M	A	L	K	L	L	K	K	V	L	-NH ₂						1,3	3,0	3,7	35,0	6,3	97
	LL-I	V	N	W	K	K	V	L	G	K	I	I	K	V	A	K	-NH ₂				0,8	1,7	14,3	15,8	9,1	>200
	LL-II	V	N	W	K	K	I	L	G	K	I	I	K	V	A	K	-NH ₂				0,7	1,4	9,0	14,4	10,0	>200
	LL-III	V	N	W	K	K	I	L	G	K	I	I	K	V	V	K	-NH ₂				0,8	1,4	3,9	18,7	11,7	>200
	LL-IV	I	K	W	G	K	I	L	K	K	I	I	K	-NH ₂							0,9	3,8	30,8	11,5	4,4	>200
	LL-V	I	N	V	G	K	I	L	K	K	I	L	R	R	-NH ₂						1,5	15,0	>100	21,7	90,0	>200
Tra	G	I	L	S	V	L	K	N	L	L	K	K	H	M	A	S	-NH ₂				2,0	7,2	41,7	46,7	11,3	>200
PNG-1	L	N	W	G	A	I	L	K	H	I	I	K	-NH ₂							1,3	3,7	10,6	51,7	7,3	120	
Anoplin	G	L	L	K	R	I	K	T	L	L	-NH ₂									5,0	20,0	>100	40,0		>200	
Indolicidin	I	L	P	W	K	W	P	W	W	P	W	R	R	-NH ₂						1,0	>100	13,0	>100		>200	
Clotrimazol																				-	-	-	-	20-60		
Tetracyklin																				7,3	1,1	0,4	55	>200	>200	

^{a)} název peptidu je odvozen od názvu příslušné volně žijící včely: MEP, *Melecta albifrons*; Coe, *Coelioxys quadridentata*; NOM, *Nomada goodeniana*; NOMF, *Nomada flava*; NOML, *Nomada lathburiana*; NOMC, *Nomada fulvicornis*; HAL-1, HAL-2, *Halictus sexinctus*; HALS, *Halictus simplex*; MAC, *Macropis fulvipes*; LL-I-V, *Lasioglossum laticeps*; Tra, *Trachusa byssinum*; PNG-1, *Panurgus calcaratus*¹⁵³

Sekvence lineárních α -helikálních AMP objevených v naší laboratoři v jedu volně žijících včel jsme porovnali se sekvencemi již dříve popsanych AMP z jedu blanokřídlého hmyzu. Naše AMP nemají žádnou podobnost s melittinem izolovaným z včely medonosné. Také podle databáze „The antimicrobial peptide database“⁷ a databáze sekvencí proteinů „Swiss-Prot and GenBank™/EMBL Data Banks“ (program Blast) jsme nenašli žádnou významnou podobnost s ostatními AMP. Pouze šest N-koncových aminokyselin peptidu HAL-1 je shodných s N-koncovou částí dermaseptinu¹⁵⁴. Určitou podobnost lze najít u anoplinu izolovaného ze soliterní vosy s lineárními α -helikálními peptidy neobsahující Pro. Některé konzervované pozice aminokyselin v lasioglossinech jsou společné také s peptidy podobnými mastoparanům ze sociálních vos protopolybia-MP a PDD-A, PDD-B. Osmin, který je také izolovaný z divoce žijící včely, má velice podobnou sekvenci s melectinem.

Biologické aktivity nově objevených antimikrobiálních peptidů v jedu volně žijících včel

Všechny AMP objevené v jedu volně žijících včel jsou účinné proti Gram-pozitivním a Gram-negativním bakteriím, zahrnující i multirezistentní kmeny *S.a.* a *P.a.*, i proti kvasinkám (Tabulka 5,6) Hodnoty MIC lineárních α -helikálních AMP se i přes podobnost v sekvenci značně liší (Tabulka 6). Mají buď mírnou nebo minimální hemolytickou aktivitu. Ve srovnání s podobně dlouhými AMP známými z literatury, anoplinem a indolicidinem (Tabulka 6), byly naše AMP v našich testech účinnější. Podobných antimikrobiálních aktivit dosahují naše AMP ve srovnání s antibiotikem tetracyklinem. Výjimku tvoří aktivita proti bakterii *S.a.*, která byla lepší v případě tetracyklinu, ale naopak proti Gram-negativní multirezistentí *P.a.* dosahovaly lepších výsledků AMP izolované v naší laboratoři. Tradiční antibiotikum tetracyklin byl účinnější v případě *S.a.*, Tyto peptidy byly také účinnější proti kvasinkám *C.a.* ve srovnání s antimykotickou látkou clotrimazolem. V případě peptidů halictinů a macropinu jsme dokázali jejich toxicitu proti některým rakovinným buňkám (buňky HeLa S3 a CEM)¹⁵⁵.

Nový hmyzí defensin z pilořitky olšové

Izolace peptidu z ovipozičního sekretu, který produkuje pilořitka olšová, byla mnohem složitější a kromě dalších čistících kroků vyžadovala více naší invence než v případě izolace AMP z jedových váčků. Také délka objeveného defensinu komplikovala stanovení celé sekvence.

AMP objevený v tomto sekretu se řadí mezi hmyzí defensiny. Podle databáze BLAST vykazuje 68% identitu s royalisinem, defensinem z hemolymfy včely medonosné, a 66%

identitu s defensiny z hemolymfy čmeláků (Tabulka 7). Tak jako většina hmyzích defensinů působí antimikrobiálně pouze proti Gram-pozitivním bakteriím.

Tabulka 7: Srovnání primární struktury defensinu pilořítky olšové s hmyzími defensiny z hemolymfy včely medonosné (*A.mellifera*) a čmeláka rolního (*B. pascuorum*)

Organismus	Primární struktura
Pilořítka olšová	VTCDLLSLNVKGIEVANSACAANCLSLGKAGGRCVGSVCQCRKTTFGKLWHDRFG-NH ₂
Včela medonosná	VTCDLLSFKGQVNSACAANCLSLGKAGGHCEKGVICIRKTSFKDLWDKRF-NH ₂
Čmelák rolní	VTCDLLSIKGVAEHSACAANCLSMGKAGGRCENAVCLCRKTNFKDLWDKRFG-NH ₂

Strukturně-aktivitní studie nových antimikrobiálních peptidů

Pomocí strukturně-aktivitní studie vybraných lineárních α -helikálních AMP (HAL-1, HAL-2 a MAC-1) jsme chtěli dosáhnout vylepšení terapeutického indexu, tedy především snížit nežádoucí toxicitu těchto AMP proti eukaryotním buňkám. Studované peptidy vytvářejí v přítomnosti TFE nebo SDS amfipatické α -helikální struktury. Modifikace primární struktury záměnou jednotlivých aminokyselin za jiné ovlivňuje jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a strukturu. Následkem takové změny dochází k ovlivnění biologických aktivit (Tabulka 8). Interpretace vlivu jednotlivých parametrů na biologický účinek je poměrně obtížná, protože záměnou i jen jediné aminokyseliny obvykle dojde k současné změně více než jednoho parametru.

Jedním z důležitých parametrů je amfipatický charakter molekuly, tj. existence polární části s kladně nabitými aminokyselinami na jedné straně molekuly, která je zásadní pro prvotní interakci AMP se záporně nabitou membránou bakterie. Z kladně nabitých aminokyselin se v peptidech izolovaných z jedových váčků blanokřídlého hmyzu nachází především Lys, výskyt Arg je méně častý. Zvýšení kladného náboje začleněním dalších Lys nebo Arg do sekvence se ukázal jako obecný postup ke zlepšení biologických aktivit a k celkovému vylepšení terapeutického indexu (př. HAL-1/10, HAL-2/4, MAC-1/9, MAC-1/10, MAC-1/31, viz Tabulka 8). Výjimku tvoří aktivita proti bakterie *S.a.*, která se často se zvyšujícím se kladným nábojem peptidu naopak snižuje (př. HAL-1/21, viz Tabulka 8). V literatuře byl popsán způsob jakým si bakterie *S.a.* vytváří rezistenci ke kationickým AMP. Ta spočívá v pozměněném povrchu membrány této bakterie, do které je zabudován L-Lys a tím se negativní náboj povrchu membrány snižuje¹⁵⁶. Dalším faktorem je produkce enzymu

aureolysinu, která *S.a.* sekretuje do svého okolí a svou proteolytickou aktivitou může deaktivovat AMP¹⁵⁷.

Tabulka 8: Přehled biologických aktivit a terapeutických indexů vybraných analogů od HAL-1, HAL-2 a MAC-1

Sekvence		Antimikrobiální aktivita MIC (μM)					Hemolytická aktivita
		<i>B.s.</i>	<i>E.c.</i>	<i>S.a.</i>	<i>P.a.</i>	<i>C.a.</i>	LC ₅₀ (μM)
HAL-1	GMWSKILGHLIR-NH ₂	0,8 103	7,7 11	3,8 22	45,0 2	6,3 13	82
HAL-1/1	GMWSKILPHLIR-NH ₂	3,3	20,0	>100	>100	20,0	>200
HAL-1/10	GMWKKILGKLIR-NH ₂	0,8 >250	2,3 >87	15 >13	13,1 >15	4,7 >43	>200
HAL-1/18	GMWSKILKHLIR-NH ₂	0,9	2,3	3,7	13,5	3,7	>200
HAL-1/21	GKWKKILGKLIR-NH ₂	1,3	1,8	60	14,2	12,5	>200
HAL-1/22	GMWSKILGHLIR-NH ₂	0,8	3,3	9,1	36,7	6	52
HAL-2	GKWMSLLKHILK-NH ₂	1,0 78	2,5 31	8,1 10	42,1 2	6,6 12	78
HAL-2/4	GKWMSLLKKILK-NH ₂	1,2 105	2,7 47	6,3 20	13,8 9	-	126
HAL-2/9	GKWQSLLKHILK-NH ₂	2,2 >91	8,0 >25	25,0 >8	56,7 >4	9,3 >22	>200
HAL-2/22	GKWMSLLKHILK-NH ₂	1,3	2,6	11,1	15,8	9,3	54
MAC-1	GFGMALKLLKKVL-NH ₂	1,3 123	3,0 53	3,7 43	35,0 5	6,3 25	160
MAC-1/1	GFGMALKLLKKVL-NH ₂	1,3	1,8	4,0	45,0	5,0	152
MAC-1/2	AFGMALKLLKKVL-NH ₂	1,3	4,7	4,7	38,3	10,0	241
MAC-1/6	GFGMALKLLKKVL-NH ₂	0,9	1,8	4,0	30,0	8,0	177
MAC-1/9	GFKMALKLLKKVL-NH ₂	1,3	2,3	5,0	11,3	4,3	199
MAC-1/10	GFKMALKLLKKVL-NH ₂	0,8 595	1,8 264	6,7 71	12,8 37	5,5 87	476
MAC-1/11	GFGMALKLLKKVL-NH ₂	4,2	25,0	41,7	100,0	26,3	>>200
MAC-1/31	GFGKALKLLKKVL-NH ₂	1,8 >444	2,5 >320	10,0 >80	10,0 >80	5,0 >160	>800

Tučně označené aminokyseliny znázorňují modifikaci oproti původnímu peptidu, *kurzívou* jsou vyznačeny D-aminokyseliny, **zeleně** jsou označeny terapeutické indexy u vybraných peptidů.

V případě dalších parametrů jako je hydrofobicita nebo α -helicitu se ukázalo, že jejich výraznější změna nevede k vylepšení terapeutického indexu, ale naopak drobné odchýlení od optimální hodnoty může způsobit ztrátu antimikrobiální aktivity a výrazný nárůst hemolytické aktivity. Např. k mírnému zlepšení antimikrobiálního účinku, ale zároveň k výraznému

zvýšení nežádoucí hemolytické aktivity vedla záměna Gly8 za Lys (HAL-1/18, viz Tabulka 8). Touto substitucí se kromě zvýšení náboje, který obvykle vede ke zvýšení účinnosti proti bakteriím, mírně také zvýšila amfipaticita analogu a s největší pravděpodobností i obsah α -helixu (obsah α -helikální struktury nebyl u tohoto peptidu experimentálně zjišťován, ale došlo k záměně Gly, aminokyseliny narušující α -helix, za Lys, aminokyselinu podporující tvorbu α -helixu). Tak jako u jiných lineárních α -helikálních AMP ukazují výsledky na skutečnost, že i u halictinů není ideální amfipaticita a α -helicita žádoucí a Gly, který narušuje α -helikální strukturu, hraje důležitou roli v selektivitě.

SAR studie macropinu ukázaly, že prodloužením délky α -helixu obsaženého v peptidu nedošlo k vylepšení biologických aktivit (MAC-1/6, viz Tabulka 8). U snížení obsahu α -helikální struktury záměnou za D-aminokyselinu jsme očekávali především snížení hemolytické aktivity. Hemolytická aktivita sice byla snížena, ale zároveň došlo ke snížení antimikrobiální aktivity, ne-li dokonce k její úplné ztrátě (př. MAC-1/11-17). Podobný efekt jsme pozorovali také u halictinů, např. u HAL-1/1 (viz Tabulka 8), kde jsme snížení obsahu α -helixu dosáhli výměnou Gly8 za Pro.

Mírné zvýšení hydrofobicity výrazně neovlivňuje antimikrobiální aktivitu a jen v některých případech došlo k zvýšení hemolytické aktivity. Naopak snížení hydrofobicity, která je nutná pro hydrofobní interakci peptidu s lipidovými řetězci mastných kyselin uvnitř membrány, může v některých případech snižovat antimikrobiální i hemolytickou aktivitu peptidu. V případě nalezení vhodné substituce však může dojít k výraznému snížení hemolytické aktivity a jen k mírnému snížení antimikrobiální aktivity, a tak k celkovému vylepšení terapeutického indexu (př. HAL-2/9, viz Tabulka 8).

SAR studiím jsme podrobili také cyklický peptid lasiocepsin. Dokázali jsme, že přítomnost disulfidických můstků není nezbytně nutná pro antimikrobiální aktivitu, ale hraje podstatnou úlohu pro zachování optimální terciární struktury lasiocepsinu, která je nicméně potřebná pro zachování jeho biologické aktivity.

Stabilita peptidů v krevním séru

Dalším cílem modifikací bylo zvýšení odolnosti AMP proti proteasám nacházejícím se v tělních tekutinách nebo proteasám, které produkují samotné bakterie. Na příkladu macropinu jsme ukázali, že sledováním míst štěpených proteasami v krevním séru a jejich cílenou modifikací lze zvýšit stabilitu peptidu, aniž bychom ztratili antimikrobiální aktivitu (př. MAC-1/6, viz Tabulka 8).

Vliv AMP na buněčné membrány

V této práci jsem také studovala působení AMP na membránu buňky, a to jak na uměle vytvořené ve formě liposomů, tak i na membrány buněk *E.c.* I přes rozsáhlé studie není přesný mechanismus účinku AMP na buněčné membrány znám a mezi jednotlivými AMP se může lišit. U většiny se předpokládá, že jejich účinek spočívá v ovlivnění struktury bakteriální membrány, a ani AMP izolované z jedu blanokřídlého hmyzu nejsou výjimkou. První informaci o mechanismu účinku nám přinesly analogy se záměnou všech L-aminokyselin v AMP za D-aminokyseliny. Tyto enantiomerní analogy halictinů (HAL-1/22, HAL-2/22) a macropinu (MAC-1/1) dosahují velmi podobných hodnot antimikrobiálních aktivit jako výchozí přírodní peptidy, což potvrzuje, že mechanismus jejich účinku nespočívá v chirálních interakcích s receptorem, tedy podobně jak je známo o interakcích hormon-receptor.

Pro další studium mechanismu účinků jsme vybrali záměrně peptidy z odlišné skupiny AMP, a to HAL-1 a Las. Na příkladu Gram-negativní bakterie *E.c.* se ukázalo, že propustnost její vnější i vnitřní membrány zvyšoval jak Las, tak HAL-1 a jejich analogy. U halictinů se ukázalo, že pro aktivitu proti *E.c.* je nezbytné narušení jak vnější, tak i vnitřní membrány. I analog s vysokými hodnotami MIC, tedy s nízkou antimikrobiální aktivitou, dokázal zvýšit propustnost vnější membrány, ale vnitřní membránu už narušit nedokázal. Cyklický Las narušuje obě membrány. Dokonce zvýšení propustnosti obou membrán jsme v případě LAS pozorovali již v koncentracích nižších než jsou hodnoty MIC. Již dříve bylo popsáno, že některé lytické peptidy dokáží narušit membránu při nízkých koncentracích, ale výrazné narušení membrány, které vede ke smrti buňky, se děje až při dosažení koncentrace peptidu přibližující se hodnotě MIC²⁸. V případě krátkého lineárního α -helikálního peptidu HAL-1 jsme tento jev nepozorovali. U HAL-1 docházelo k propustnosti membrány až v přítomnosti peptidu v koncentraci odpovídající MIC. Tedy můžeme dedukovat, že halictiny působí jiným mechanismem než Las.

Ze studií interakcí našich peptidů s uměle vytvořenými membránami se potvrdil význam CL v bakteriální membráně pro antimikrobiální aktivitu halictinů i aktivitu Las. CL, jenž je složkou bakteriálních membrán, je objemný fosfolipid složený ze dvou fosfaditylglycerolů vzájemně propojených glycerolem. Např. pro bakterie *B.s.* je typický zvýšený výskyt CL na pólech nebo v oblasti septa¹⁸. Působení Las právě na pólech buňky *B.s.* a znatelný výtok obsahu bakterie do okolí jsme pozorovali pomocí transmisního elektronového mikroskopu (Příloha 2, Fig. 6). Podobná pozorování již byla popsána i pro jiné AMP jako jsou králíčí defensiny nebo anoplin^{158,159,160,161}.

6. Literatura

- ¹ Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, 10, 226-263
- ² Hardy, K. J., Hawkey, P. M., Gao, F., & Oppenheim, B. A. (2004). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. *British Journal of Anaesthesia*, 92(1), 121-130
- ³ Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433
- ⁴ Brogden, N. K., & Brogden, K. A. (2011). Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(3), 217-225
- ⁵ Marr, A. K., Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: Obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(5), 468-472
- ⁶ Gottler, L. M., & Ramamoorthy, A. (2009). Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan - A highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(8), 1680-1686
- ⁷ Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2009). APD2: The updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1), D933-D937
- ⁸ De Yang, B., Chen, Q., Schmidt, A. P., Anderson, G. M., Wang, J. M., Wooters, J., Oppenheim, J.J., & Chertov, O. (2000). LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 192(7), 1069-1074
- ⁹ Brown, K. L., & Hancock, R. E. W. (2006). Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology*, 18(1), 24-30

- ¹⁰ Mander, L., & Liu, H.-W. (2010). *Coprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, Volume 5: Amino acids, peptides and proteins. Amsterdam: Elsevier
- ¹¹ Masson, P. L., Heremans, J. F., Prignot, J. J., & Wauters, G. (1966). Immunohistochemical localization and bacteriostatic properties of an iron-binding protein from bronchial mucus. *Thorax*, 21(6), 538-544
- ¹² Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., & Tomita, M. (1992). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1121(1-2), 130-136
- ¹³ Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238-250
- ¹⁴ Paulmann, M., Arnold, T., Linke, D., Özdirekcan, S., Kopp, A., Gutschmann, T., Kalbacher, H., Wanke, I., Schuenemann, V.J., Habeck, M., Bürck, J., Ulrich, A.S., & Schitteck, B. (2012). Structure-activity analysis of the dermcidin-derived peptide DCD-1L, an anionic antimicrobial peptide present in human sweat. *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 8434-8443
- ¹⁵ Hancock, R. E. (2001). Cationic peptides: Effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infectious Diseases*, 1(3), 156-164
- ¹⁶ Takahashi, D., Shukla, S. K., Prakash, O., & Zhang, G. (2010). Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie*, 92(9), 1236-1241
- ¹⁷ Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462(1-2), 55-70
- ¹⁸ Barák, I., & Muchová, K. (2013). The role of lipid domains in bacterial cell processes. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 4050-4065
- ¹⁹ Saberwal, G., & Nagaraj, R. (1994). Cell-lytic and antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membranes: Facets of their conformational features,

structure-function correlations and membrane-perturbing abilities. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, 1197(2), 109-131

²⁰ Mor, A. (2000). Peptide-based antibiotics: A potential answer to raging antimicrobial resistance. *Drug Development Research*, 50(3-4), 440-447

²¹ Rapaport, D., & Shai, Y. (1991). Interaction of fluorescently labeled pardaxin and its analogues with lipid bilayers. *Journal of Biological Chemistry*, 266(35), 23769-23775

²² Ludtke, S. J., He, K., Heller, W. T., Harroun, T. A., Yang, L., & Huang, H. W. (1996). Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry*, 35(43), 13723-13728

²³ Toke, O. (2005). Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 80(6), 717-735

²⁴ Dennison, S. R., Wallace, J., Harris, F., & Phoenix, D. A. (2005). Amphiphilic α -helical antimicrobial peptides and their structure-function relationships. *Protein and Peptide Letters*, 12(1), 31-39

²⁵ Wimley, W. C., & Hristova, K. (2011). Antimicrobial peptides: Successes, challenges and unanswered questions. *The Journal of Membrane Biology*, 239(1-2), 27-34

²⁶ Gazit, E., Boman, A., Boman, H. G., & Shai, Y. (1995). Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 34(36), 11479-11488

²⁷ Oren, Z., & Shai, Y. (1998). Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 47(6), 451-463

²⁸ Bechinger, B., & Lohner, K. (2006). Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758(9), 1529-1539

²⁹ Wimley, W. C. (2010). Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chemical Biology*, 5(10), 905-917

³⁰ Epand, R. M., & Epand, R. F. (2009). Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(1), 289-294

- ³¹ Mangoni, M. L. (2011). Host-defense peptides: From biology to therapeutic strategies. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(13), 2157-2159
- ³² Tossi, A., Sandri, L., & Giangaspero, A. (2000). Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 55(1), 4-30
- ³³ Barra, D., & Simmaco, M. (1995). Amphibian skin: A promising resource for antimicrobial peptides. *Trends in Biotechnology*, 13(6), 205-209
- ³⁴ Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., & Boman, H. G. (1980). Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry*, 106(1), 7-16
- ³⁵ Habermann, E. (1972). Bee and wasp venoms. *Science*, 177(4046), 314-322
- ³⁶ Dempsey, C. E. (1990). The actions of melittin on membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, 1031(2), 143-161
- ³⁷ Primor, N., & Tu, A. T. (1980). Conformation of pardaxin, the toxin of the flatfish *Pardachirus marmoratus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 626(2), 299-306
- ³⁸ Bechinger, B. (1997). Structure and functions of channel-forming peptides: Magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *Journal of Membrane Biology*, 156(3), 197-211
- ³⁹ Srisailam, S., Arunkumar, A. I., Wang, W., Yu, C., & Chen, H. M. (2000). Conformational study of a custom antibacterial peptide cecropin B1: Implications of the lytic activity. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1479(1-2), 275-285
- ⁴⁰ Zasloff, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from xenopus skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(15), 5449-5453
- ⁴¹ Bechinger, B., Zasloff, M., & Opella, S. J. (1993). Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Science*, 2(12), 2077-2084

- ⁴² Bals, R., & Wilson, J. M. (2003). Cathelicidins - A family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(4), 711-720
- ⁴³ Méndez-Samperio, P. (2010). The human cathelicidin hCAP18/LL-37: A multifunctional peptide involved in mycobacterial infections. *Peptides*, 31(9), 1791-1798
- ⁴⁴ Tossi, A., & Sandri, L. (2002). Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides. *Current Pharmaceutical Design*, 8(9), 743-761
- ⁴⁵ Haney, E. F., Hunter, H. N., Matsuzaki, K., & Vogel, H. J. (2009). Solution NMR studies of amphibian antimicrobial peptides: Linking structure to function? *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(8), 1639-1655
- ⁴⁶ Miyasaki, K. T., & Lehrer, R. I. (1998). β -sheet antibiotic peptides as potential dental therapeutics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 9(4), 269-280
- ⁴⁷ Morikawa, N., Hagiwara, K., & Nakajima, T. (1992). Brevinin-1 and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog, *Rana brevipoda porsa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 189(1), 184-190
- ⁴⁸ Park, J. M., Jung, J.-M., & Lee, B. J. (1994). Antimicrobial peptides from the skin of a korean frog, *Rana rugosa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 205(1), 948-954
- ⁴⁹ Conlon, J. M. (2011). Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(13), 2303-2315
- ⁵⁰ Ganz, T. (2003). Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3(9), 710-720
- ⁵¹ Ganz, T., & Lehrer, R. I. (1994). Defensins. *Current Opinion in Immunology*, 6(4), 584-589
- ⁵² Bulet, P., Stöcklin, R., & Menin, L. (2004). Anti-microbial peptides: From invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*, 198, 169-184
- ⁵³ Selsted, M. E., Novotny, M. J., Morris, W. L., Tang, Y.-Q., Smith, W., & Cullor, J. S. (1992). Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 267(7), 4292-4295

- ⁵⁴ Falla, T. J., & Hancock, R. E. W. (1997). Improved activity of a synthetic indolicidin analog. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(4), 771-775
- ⁵⁵ Chan, D. I., Prenner, E. J., & Vogel, H. J. (2006). Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758(9), 1184-1202
- ⁵⁶ Nan, Y. H., Bang, J.-K., & Shin, S. Y. (2009). Design of novel indolicidin-derived antimicrobial peptides with enhanced cell specificity and potent anti-inflammatory activity. *Peptides*, 30(5), 832-838
- ⁵⁷ Vilmos, P., & Kurucz, E. (1998). Insect immunity: Evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters*, 62(2), 59-66
- ⁵⁸ Hoffmann, J. A. (1995). Innate immunity of insects. *Current Opinion in Immunology*, 7(1), 4-10
- ⁵⁹ Boulanger, N., Bulet, P., & Lowenberger, C. (2006). Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *Trends in Parasitology*, 22(6), 262-268
- ⁶⁰ Hoffmann, J. A., & Reichhart, J.-M. (2002). Drosophila innate immunity: An evolutionary perspective. *Nature Immunology*, 3(2), 121-126
- ⁶¹ Kuhn-Nentwig, L. (2003). Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(12), 2651-2668
- ⁶² Otvos, L. (2000). Antimicrobial peptides isolated from the insects. *Journal of Peptide Science*, 6(10), 497-511
- ⁶³ Cociancich, S., Bulet, P., Hetru, C., & Hoffmann, J. A. (1994). The inducible antibacterial peptides of insects. *Parasitology Today*, 10(4), 132-139
- ⁶⁴ Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., & Boman, H. G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292(5820), 246-248
- ⁶⁵ Holak, T. A., Engström, Å., Kraulis, P. J., Lindeberg, G., Bennich, H., Jones, T. A., Gronenborn, A. M., & Clore, G. M. (1988). The solution conformation of the antibacterial

peptide cecropin A: A nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry*, 27(20), 7620-7629

⁶⁶ Lee, J.-Y., Boman, A., Chuanxin, S., Andersson, M., Jornvall, H., Mutt, V., & Boman, H. G. (1989). Antibacterial peptides from pig intestine: Isolation of a mammalian cecropin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(23), 9159-9162

⁶⁷ Vunnam, S., Juvvadi, P., & Merrifield, R. B. (1997). Synthesis and antibacterial action of cecropin and proline-arginine- rich peptides from pig intestine. *Journal of Peptide Research*, 49(1), 59-66

⁶⁸ Hara, S., & Yamakawa, M. (1995). Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(50), 29923-29927

⁶⁹ Oizumi, Y., Hemmi, H., Minami, M., Asaoka, A., & Yamakawa, M. (2005). Isolation, gene expression and solution structure of a novel moricin analogue, antibacterial peptide from a lepidopteran insect, *Spodoptera litura*. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1752(1), 83-92

⁷⁰ Dai, H., Rayaprolu, S., Gong, Y., Huang, R., Prakash, O. M., & Jiang, H. (2008). Solution structure, antibacterial activity, and expression profile of *manduca sexta* moricin. *Journal of Peptide Science*, 14(7), 855-86

⁷¹ Matsuyama, K., & Natori, S. (1988). Molecular cloning of cDNA for sapecin and unique expression of the sapecin gene during the development of *Sarcophaga peregrina*. *Journal of Biological Chemistry*, 263(32), 17117-17121

⁷² Lambert, J., Keppi, E., Dimarcq, J. L., Wicker, C., Reichhart, J. M., Dunbar, B., Lepage, P., Van Dorsselaer, A., Hoffmann, J., & Fothergill, J. (1989). Insect immunity: Isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(1), 262-266

⁷³ Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., & Kobayashi, K. (1990). A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *Journal of Biological Chemistry*, 265(19), 11333-11337

- ⁷⁴ Rees, J. A., Moniatte, M., & Bulet, P. (1997). Novel antibacterial peptides isolated from a european bumblebee, *Bombus pascuorum* (hymenoptera, apoidea). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(5), 413-422
- ⁷⁵ Dimarcq, J.-L., Bulet, P., Hetru, C., & Hoffmann, J. (1998). Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 47(6), 465-477
- ⁷⁶ Čerovský, V., Žďárek, J., Fučík, V., Monincová, L., Voburka, Z., & Bém, R. (2010). Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(3), 455-466
- ⁷⁷ Čerovský, V., Slaninová, J., Fučík, V., Monincová, L., Bednárová, L., Maloň, P., & Štokrová, J. (2011). Lucifensin, a novel insect defensin of medicinal maggots: Synthesis and structural study. *ChemBioChem*, 12(9), 1352-1361
- ⁷⁸ Shazely, B. E., Veverka, V., Fučík, V., Voburka, Z., Žďárek, J., & Čerovský, V. (2013). Lucifensin II, a defensin of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, 50(3), 571-578
- ⁷⁹ Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W. F., Hetru, C., & Hoffmann, J. A. (1994). Insect immunity: Septic injury of drosophila induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 269(52), 33159-33163
- ⁸⁰ Lamberty, M., Caille, A., Landon, C., Tassin-Moindrot, S., Hetru, C., Bulet, P., & Vovelle, F. (2001). Solution structures of the antifungal heliomicin and a selected variant with both antibacterial and antifungal activities. *Biochemistry*, 40(40), 11995-12003
- ⁸¹ Schuhmann, B., Seitz, V., Vilcinskas, A., & Podsiadlowski, L. (2003). Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 53(3), 125-133
- ⁸² Landon, C., Sodano, P., Hetru, C., Hoffmann, J., & Ptak, M. (1997). Solution structure of drosomycin, the first inducible antifungal protein from insects. *Protein Science*, 6(9), 1878-1884

- ⁸³ Lamberty, M., Zachary, D., Lanot, R., Bordereau, C., Robert, A., Hoffmann, J. A., & Bulet, P. (2001). Insect immunity. constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 4085-4092
- ⁸⁴ Fehlbauer, P., Bulet, P., Chernysh, S., Briand, J.-P., Roussel, J.-P., Letellier, L., Hetru, C., & Hoffmann, J. A. (1996). Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(3), 1221-1225
- ⁸⁵ Mandard, N., Sodano, P., Labbe, H., Bonmatin, J.-M., Bulet, P., Hetru, C., Ptak, M., & Vovelle, F. (1998). Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two-dimensional nuclear magnetic resonance data. *European Journal of Biochemistry*, 256(2), 404-410
- ⁸⁶ Scocchi, M., Tossi, A., & Gennaro, R. (2011). Proline-rich antimicrobial peptides: Converging to a non-lytic mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(13), 2317-2330
- ⁸⁷ Bulet, P., & Stöcklin, R. (2005). Insect antimicrobial peptides: Structures, properties and gene regulation. *Protein and Peptide Letters*, 12(1), 3-11
- ⁸⁸ Bulet, P., Dimarcq, J.-L., Hetru, C., Lagueux, M., Charlet, M., Hegy, G., Van Dorsselaer, A., & Hoffmann, J. A. (1993). A novel inducible antibacterial peptide of drosophila carries an O- glycosylated substitution. *Journal of Biological Chemistry*, 268(20), 14893-14897
- ⁸⁹ Mackintosh, J. A., Veal, D. A., Beattie, A. J., & Gooley, A. A. (1998). Isolation from an ant *Myrmecia gulosa* of two inducible O-glycosylated proline-rich antibacterial peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 273(11), 6139-6143
- ⁹⁰ Cociancich, S., Dupont, A., Hegy, G., Lanot, R., Holder, F., Hetru, C., Hoffmann, J.A., & Bulet, P. (1994). Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, the sap-sucking bug *Pyrrhocoris apterus*. *Biochemical Journal*, 300(2), 567-575
- ⁹¹ Chernysh, S., Cociancich, S., Briand, J.-P., Hetru, C., & Bulet, P. (1996). The inducible antibacterial peptides of the hemipteran insect *Palomena prasina*: Identification of a unique family of proline-rich peptides and of a novel insect defensin. *Journal of Insect Physiology*, 42(1), 81-89

- ⁹² Rahnamaeian, M., Langen, G., Imani, J., Khalifa, W., Altincicek, B., Von Wettstein, D., Kogel, K.-H., & Vilcinskas, A. (2009). Insect peptide metchnikowin confers on barley a selective capacity for resistance to fungal ascomycetes pathogens. *Journal of Experimental Botany*, 60(14), 4105-4114
- ⁹³ Hara, S., & Yamakawa, M. (1995). A novel antibacterial peptide family isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochemical Journal*, 310(2), 651-656
- ⁹⁴ Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., Van Damme, J., Ellicone, C., Fleming, M., Jacobs, F., & Tempst, P. (1990). Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry*, 187(2), 381-386
- ⁹⁵ Carlsson, A., Engstrom, P., Palva, E. T., & Bennich, H. (1991). Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with Omp gene transcription. *Infection and Immunity*, 59(9), 3040-3045
- ⁹⁶ Ando, K., Okada, M., & Natori, S. (1987). Purification of sarcotoxin II, antibacterial proteins of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. *Biochemistry*, 26(1), 226-230
- ⁹⁷ Dimarcq, J. L., Keppi, E., Dunbar, B., Lambert, J., Reichhart, J. M., Hoffmann, D., Rankine, S.M., Fothergill, J.E., & Hoffmann, J. A. (1988). Insect immunity. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino-acid sequence of the predominant member, dipteracin A. *European Journal of Biochemistry*, 171(1-2), 17-22
- ⁹⁸ Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., & Tempst, P. (1993). Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Biological Chemistry*, 268(10), 7044-7054
- ⁹⁹ Cudic, M., Bulet, P., Hoffmann, R., Craik, D. J., & Otvos Jr., L. (1999). Chemical synthesis, antibacterial activity and conformation of dipteracin, an 82-mer peptide originally isolated from insects. *European Journal of Biochemistry*, 266(2), 549-558
- ¹⁰⁰ Bulet, P., Cociancich, S., Dimarcq, J.-L., Lambert, J., Reichhart, J.-M., Hoffmann, D., Hetru, C., & Hoffmann, J. A. (1991). Insect immunity: Isolation from a coleopteran insect of

a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. *Journal of Biological Chemistry*, 266(36), 24520-24525

¹⁰¹ Axén, A., Carlsson, A., Engström, Å., & Bennich, H. (1997). Gloverin, an antibacterial protein from the immune hemolymph of *Hyalophora pupae*. *European Journal of Biochemistry*, 247(2), 614-619

¹⁰² Moreau, S. J. M. (2013). "It stings a bit but it cleans well" : Venoms of hymenoptera and their antimicrobial potential. *Journal of Insect Physiology*, 59(2), 186-204

¹⁰³ Wilson-Rich, N., Spivak, M., Fefferman, N. H., & Starks, P. T. (2009). Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annual Review of Entomology*, 54, 405-423

¹⁰⁴ Niemz, A., & Tirrell, D. A. (2001). Self-association and membrane-binding behavior of melittins containing trifluoroleucine. *Journal of the American Chemical Society*, 123(30), 7407-7413

¹⁰⁵ Raghuraman, H., & Chattopadhyay, A. (2007). Melittin: A membrane-active peptide with diverse functions. *Bioscience Reports*, 27(4-5), 189-223

¹⁰⁶ Boman, H. G., Wade, D., Boman, I. A., Wahlin, B., & Merrifield, R. B. (1989). Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids. *FEBS Letters*, 259(1), 103-106

¹⁰⁷ Oršolić, N. (2012). Bee venom in cancer therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(1-2), 173-194

¹⁰⁸ Wachinger, M., Saermark, T., & Erfle, V. (1992). Influence of amphipathic peptides on the HIV-1 production in persistently infected T lymphoma cells. *FEBS Letters*, 309(3), 235-241

¹⁰⁹ Diaz-Achirica, P., Prieto, S., Ubach, J., Andreu, D., Rial, E., & Rivas, L. (1994). Permeabilization of the mitochondrial inner membrane by short cecropin-A-melittin hybrid peptides. *European Journal of Biochemistry*, 224(1), 257-263

¹¹⁰ Adade, C. M., Oliveira, I. R. S., Pais, J. A. R., & Souto-Padrón, T. (2013). Melittin peptide kills trypanosoma cruzi parasites by inducing different cell death pathways. *Toxicon*, 69, 227-239

- ¹¹¹ Shorina, E. A., Dolgova, N. V., Rubtsov, A. M., Storey, K. B., & Lopina, O. D. (2004). Melittin induces both time-dependent aggregation and inhibition of Na,K-ATPase from duck salt glands however these two processes appear to occur independently. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1661(2), 188-195
- ¹¹² Mingarro, I., Pérez-Payá, E., Pinilla, C., Appel, J. R., Houghten, R. A., & Blondelle, S. E. (1995). Activation of bee venom phospholipase A2 through a peptide-enzyme complex. *FEBS Letters*, 372(1), 131-134
- ¹¹³ Zhao, H., & Kinnunen, P. K. J. (2003). Modulation of the activity of secretory phospholipase A2 by antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 965-971
- ¹¹⁴ Kreil, G. (1990). Processing of precursors by dipeptidylaminopeptidases: A case of molecular ticketing. *Trends in Biochemical Sciences*, 15(1), 23-26
- ¹¹⁵ Argiolas, A., & Pisano, J. J. (1985). Bombolitin, a new class of mast cell degranulating peptides from the venom of the bumblebee *Megabombus pennsylvanicus*. *Journal of Biological Chemistry*, 260(3), 1437-1444
- ¹¹⁶ Favreau, P., Menin, L., Michalet, S., Perret, F., Cheneval, O., Stöcklin, M., Bulet, P., & Stöcklin, R. (2006). Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: Case applications with single arthropod specimen. *Toxicon*, 47(6), 676-687
- ¹¹⁷ Choo, Y. M., Lee, K. S., Yoon, H. J., Je, Y. H., Lee, S. W., Sohn, H. D., & Jin, B. R. (2010). Molecular cloning and antimicrobial activity of bombolitin, a component of bumblebee *Bombus ignitus* venom. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 156(3), 168-173
- ¹¹⁸ Argiolas, A., & Pisano, J. J. (1984). Isolation and characterization of two new peptides, mastoparan C and crabrolin, from the venom of the european hornet, vespa crabro. *Journal of Biological Chemistry*, 259(16), 10106-10111
- ¹¹⁹ Hirai, Y., Yasuhara, T., Yoshida, H., Nakajima, T., Fujino, M., & Kitada, C. (1979). A new mast cell degranulating peptide 'mastoparan' the venom of *Vespula lewisii*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 27(8), 1942-1944

- ¹²⁰ Krishnakumari, V., & Nagaraj, R. (1997). Antimicrobial and hemolytic activities of crabrolin, a 13-residue peptide from the venom of the european hornet, *Vespa crabro*, and its analogs. *Journal of Peptide Research*, 50(2), 88-93
- ¹²¹ Shpakov, A. O., & Pertseva, M. N. (2006). Molecular mechanisms for the effect of mastoparan on G proteins in tissues of vertebrates and invertebrates. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 141(3), 302-306
- ¹²² Hori, Y., Demura, M., Iwadate, M., Ulrich, A. S., Niidome, T., Aoyagi, H., & Asakura, T. (2001). Interaction of mastoparan with membranes studied by ¹H-NMR spectroscopy in detergent micelles and by solid-state ²H-NMR and ¹⁵N-NMR spectroscopy in oriented lipid bilayers. *European Journal of Biochemistry*, 268(2), 302-309
- ¹²³ Todokoro, Y., Yumen, I., Fukushima, K., Kang, S.-W., Park, J.-S., Kohno, T., Wakamatsu, K., Akutsu, H., Fujiwara, T. (2006). Structure of tightly membrane-bound mastoparan-X, a G-protein-activating peptide, determined by solid-state NMR. *Biophysical Journal*, 91(4), 1368-1379
- ¹²⁴ Souza, B. M., Mendes, M. A., Santos, L. D., Marques, M. R., César, L. M. M., Almeida, R. N. A., Pagnocca, F. C., Konno, K., Palma, M. S. (2005). Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides*, 26(11), 2157-2164
- ¹²⁵ Dos Santos Cabrera, M. P., Costa, S. T. B., De Souza, B. M., Palma, M. S., Ruggiero, J. R., & Ruggiero Neto, J. (2008). Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide polybia-MP1. *European Biophysics Journal*, 37(6), 879-891
- ¹²⁶ Čeřovský, V., Slaninová, J., Fučík, V., Hulačová, H., Borovičková, L., Ježek, R., & Bednářová, L. (2008). New potent antimicrobial peptides from the venom of polistinae wasps and their analogs. *Peptides*, 29(6), 992-1003
- ¹²⁷ Mendes, M. A., De Souza, B. M., & Palma, M. S. (2005). Structural and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). *Toxicon*, 45(1), 101-106
- ¹²⁸ Konno, K., Hisada, M., Naoki, H., Itagaki, Y., Kawai, N., Miwa, A., Yasuhara, T., Morimoto, Y., & Nakata, Y. (2000). Structure and biological activities of eumenine

mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). *Toxicon*, 38(11), 1505-1515

¹²⁹ Konno, K., Hisada, M., Naoki, H., Itagaki, Y., Fontana, R., Rangel, M., Oliveira, J. S., Cabrera, M.P.d.S, Neto, J.R., Hide, I., Nakata, Y., Yasuhara, T., & Nakajima, T. (2006). Eumenitin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Eumenes rubronotatus*. *Peptides*, 27(11), 2624-2631

¹³⁰ Konno, K., Hisada, M., Fontana, R., Lorenzi, C. C. B., Naoki, H., Itagaki, Y., Miwa, A., Kawai, N., Nakata, Y., Yasuhara, T., Ruggiero Neto, J., De Azevedo Jr., W.F., Palma, M.S., & Nakajima, T. (2001). Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1550(1), 70-80

¹³¹ Konno, K., Rangel, M., Oliveira, J. S., dos Santos Cabrera, M. P., Fontana, R., Hirata, I. Y., Hide, I., Nakata, Y., Mori, K., Kawano, M., Fuchino, H., Sekita, S., & Neto, J. R. (2007). Decoralin, a novel linear cationic α -helical peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Oreumenes decoratus*. *Peptides*, 28(12), 2320-2327

¹³² Čeřovský, V., Hovorka, O., Cvačka, J., Voburka, Z., Bednářová, L., Borovičková, L., Slaninová, J., Fučík, V. (2008). Melectin: A novel antimicrobial peptide from the venom of the cleptoparasitic bee *Melecta albifrons*. *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology*, 9(17), 2815-2821

¹³³ Stöcklin, R., Favreau, P., Thai, R., Pflugfelder, J., Bulet, P., & Mebs, D. (2010). Structural identification by mass spectrometry of a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary bee *Osmia rufa* (Hymenoptera: Megachilidae). *Toxicon*, 55(1), 20-27

¹³⁴ Čeřovský, V., Buděšínsky, M., Hovorka, O., Cvačka, J., Voburka, Z., Slaninová, J., Borovičková, L., Fučík, V., Bednářová, L., Vortruba, I., & Straka, J. (2009). Lasioglossins: Three novel antimicrobial peptides from the venom of the eusocial bee *Lasioglossum laticeps* (Hymenoptera: Halictidae). *ChemBioChem*, 10(12), 2089-2099

¹³⁵ Mishra, B., Basu, A., Saravanan, R., Xiang, L., Yang, L. K., & Leong, S. S. J. (2013). Lasioglossin-III: Antimicrobial characterization and feasibility study for immobilization applications. *RSC Advances*, 3(24), 9534-9543

- ¹³⁶ Bandyopadhyay, S., Lee, M., Sivaraman, J., & Chatterjee, C. (2013). Model membrane interaction and DNA-binding of antimicrobial peptide lasioglossin II derived from bee venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(1), 1-6
- ¹³⁷ Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J.-P., Krier, F., Revol-Junelles, A.-M., Longeon, A., Chaffotte, A., Dejean, A., & Rossier, J. (2001). Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 17823-17829
- ¹³⁸ Inagaki, H., Akagi, M., Imai, H. T., Taylor, R. W., & Kubo, T. (2004). Molecular cloning and biological characterization of novel antimicrobial peptides, pilosulin 3 and pilosulin 4, from a species of the Australian ant genus *Myrmecia*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 428(2), 170-178
- ¹³⁹ Zelezetsky, I., Pag, U., Antcheva, N., Sahl, H.-G., & Tossi, A. (2005). Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 434(2), 358-364
- ¹⁴⁰ Inagaki, H., Akagi, M., Imai, H. T., Taylor, R. W., Wiese, M. D., Davies, N. W., & Kubo, T. (2008). Pilosulin 5, a novel histamine-releasing peptide of the Australian ant, *Myrmecia pilosula* (jack jumper ant). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 477(2), 411-416
- ¹⁴¹ Rifflet, A., Gavalda, S., Téné, N., Orivel, J., Leprince, J., Guilhaudis, L., Génin, E., Vétillard, A., & Treilhou, M. (2012). Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide from the venom of the ant *Tetramorium bicarinatum*. *Peptides*, 38(2), 363-370
- ¹⁴² Giangaspero, A., Sandri, L., & Tossi, A. (2001). Amphipathic α -helical antimicrobial peptides: A systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. *European Journal of Biochemistry*, 268(21), 5589-5600
- ¹⁴³ Eisenberg, D., Weiss, R. M., Terwilliger, T. C., & Wilcox, W. (1982). Hydrophobic moments and protein structure. *Faraday Symposia of the Chemical Society*, 17, 109-120
- ¹⁴⁴ Sato, H., & Feix, J. B. (2008). Lysine-enriched cecropin-mellitin antimicrobial peptides with enhanced selectivity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(12), 4463-4465

- ¹⁴⁵ Dathe, M., & Wieprecht, T. (1999). Structural features of helical antimicrobial peptides: Their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462(1-2), 71-87
- ¹⁴⁶ Doig, A. J., & Baldwin, R. L. (1995). N- and C-capping preferences for all 20 amino acids in α -helical peptides. *Protein Science*, 4(7), 1325-1336
- ¹⁴⁷ Dauplais, M., Lecoq, A., Song, J., Cotton, J., Jamin, N., Gilquin, B., Roumestand, C., Vita, C., De Medeiros, C.L.C., Rowan, E.G., Harvey, A.L., & Ménez, A. (1997). On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. *Journal of Biological Chemistry*, 272(7), 4302-4309
- ¹⁴⁸ Ovchinnikova, T. V., Balandin, S. V., Aleshina, G. M., Tagaev, A. A., Leonova, Y. F., Krasnodembsky, E. D., Men'shenin, A.V., & Kokryakov, V. N. (2006). Aurelin, a novel antimicrobial peptide from jellyfish *Aurelia aurita* with structural features of defensins and channel-blocking toxins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348(2), 514-523
- ¹⁴⁹ Rangaraju, S., Khoo, K. K., Feng, Z.-P., Crossley, G., Nugent, D., Khaytin, I., Chi, V., Pham, C., Calabresi, P., Pennington, M.W., Norton, R.S., & Chandy, K.G. (2010). Potassium channel modulation by a toxin domain in matrix metalloprotease 23. *Journal of Biological Chemistry*, 285(12), 9124-9136
- ¹⁵⁰ Shenkarev, Z. O., Pantelev, P. V., Balandin, S. V., Gizatullina, A. K., Altukhov, D. A., Finkina, E. I., Kokryakov, V.N., Arseniev, A.S., & Ovchinnikova, T. V. (2012). Recombinant expression and solution structure of antimicrobial peptide aurelin from jellyfish *Aurelia aurita*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 429(1-2), 63-69
- ¹⁵¹ Šrůtka, P. (2006). Vztah kambiofágního a xylofágního hmyzu a jeho doprovodné mykobioty. *Disertační práce*, Praha: Česká zemědělská universita
- ¹⁵² Cautts, M. P. (1969). The mechanism of pathogenicity of *Sirex noctilio* on *Pinus radiata*. II. Effects of *S. noctilio* mucus. *Australian Journal of Biological Sciences*, 22(4), 915-924
- ¹⁵³ Čujová, S., Slaninová, J., Monincová, L., Fučík, V., Bednářová, L., Štokrová, J., Hovorka, O., Voburka, Z., Straka, J., & Čerovský, V. (2013). Panurgines, novel antimicrobial peptides

from the venom of communal bee *Panurgus calcaratus* (Hymenoptera: Andrenidae). *Amino Acids*, 45(1), 143-157

¹⁵⁴ Wechselberger, C. (1998). Cloning of cDNAs encoding new peptides of the dermaseptin-family. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1388(1), 279-283

¹⁵⁵ Slaninová, J., Mlsová, V., Kroupová, H., Alán, L., Tůmová, T., Monincová, L., Borovičková, L., Fučík, V., & Čerovský, V. (2012). Toxicity study of antimicrobial peptides from wild bee venom and their analogs toward mammalian normal and cancer cells. *Peptides*, 33(1), 18-26

¹⁵⁶ Peschel, A., Jack, R. W., Otto, M., Collins, L. V., Staubitz, P., Nicholson, G., Kalbacher, H., Nieuwenhuizen, W.F., Jung, G., Tarkowski, A., Van Kessel, K.P.M., & Van Strijp, J. A. G. (2001). *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine. *Journal of Experimental Medicine*, 193(9), 1067-1076

¹⁵⁷ Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., Wójcik, K., Puklo, M., Lupa, B., Suder, P., Silberring, J., Reed, M., Pohl, J., Shafer, W., McAleese, F., Foster, T., Travis, J., & Potempa, J. (2004). Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by staphylococcus aureus-derived proteinases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(12), 4673-4679

¹⁵⁸ Hristova, K., Selsted, M. E., & White, S. H. (1997). Critical role of lipid composition in membrane permeabilization by rabbit neutrophil defensins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(39), 24224-24233

¹⁵⁹ Hadjicharalambous, C., Sheynis, T., Jelinek, R., Shanahan, M. T., Ouellette, A. J., & Gizeli, E. (2008). Mechanisms of α -defensin bactericidal action: Comparative membrane disruption by cryptdin-4 and its disulfide-null analogue. *Biochemistry*, 47(47), 12626-12634

¹⁶⁰ Domenech, O., Francius, G., Tulkens, P. M., Van Bambeke, F., Dufrêne, Y., & Mingeot-Leclercq, M.-P. (2009). Interactions of oritavancin, a new lipoglycopeptide derived from vancomycin, with phospholipid bilayers: Effect on membrane permeability and nanoscale lipid membrane organization. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(9), 1832-1840

¹⁶¹ Won, A., Khan, M., Gustin, S., Akpawu, A., Seebun, D., Avis, T.J., Leung, B.O., Hitchcock, A., Planoul, A. (2011). Investigating the effects of L- to D-amino acid substitution and deamidation on the activity and membrane interactions of antimicrobial peptide anoplin. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(6), 1592-1600

7. Seznam publikací

Publikace, které jsou součástí dizertační práce

1. Monincová, L., Buděšínský, M., Slaninová, J., Hovorka, O., Cvačka, J., Voburka, Z., Fučík, V., Borovičková, L., Bednářová, L., Straka, J., & Čerovský, V. (2010). Novel antimicrobial peptides from the venom of the eusocial bee halictus sexcinctus (hymenoptera: Halictidae) and their analogs. *Amino Acids*, 39(3), 763-775

IF = 3,914

2. Monincová, L., Slaninová, J., Fucík, V., Hovorka, O., Voburka, Z., Bednářová, L., Maloň, P., Štokrová, J., & Čerovský, V. (2012). Lasiocepsin, a novel cyclic antimicrobial peptide from the venom of eusocial bee lasioglossum laticeps (hymenoptera: Halictidae). *Amino Acids*, 43(2), 751-761

IF = 3,914

3. Monincová, L., Buděšínský, M., Čujová, S., Čerovský, V., & Veverka, V. (2014). Structural basis for antimicrobial activity of lasiocepsin. *ChemBioChem*, 15(2), 301-308

IF = 3,740

4. Monincová, L., Veverka, V., Slaninová, J., Buděšínský, M., Fučík, V., Bednářová, L., Straka, J., & Čerovský, V. (2014). Structure-activity study of macropin, a novel antimicrobial peptide from the venom of solitary *Macropis fulvipes* (Hymenoptera: Melittidae). *Journal of Peptide Science*. 20(6), 375-384.

IF = 2,071

Publikace, které nejsou součástí dizertační práce

5. Čerovský, V., Žďárek, J., Fučík, V., Monincová, L., Voburka, Z., & Bém, R. (2010). Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly lucilia sericata. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(3), 455-466

IF = 5,615

6. Slaninová, J., Putnová, H., Borovičková, L., Šácha, P., Čerovský, V., Monincová, L., & Fučík, V. (2011). The antifungal effect of peptides from hymenoptera venom and their analogs. *Central European Journal of Biology*, 6(2), 150-159

IF = 0,818

7. Čeřovský, V., Slaninová, J., Fučík, V., Monincová, L., Bednářová, L., Maloň, P., & Štokrová, J. (2011). Lucifensin, a novel insect defensin of medicinal maggots: Synthesis and structural study. *ChemBioChem*, 12(9), 1352-1361

IF = 3,740

8. Chapuis, H., Slaninová, J., Bednářová, L., Monincová, L., Buděšínský, M., & Čeřovský, V. (2012). Effect of hydrocarbon stapling on the properties of α -helical antimicrobial peptides isolated from the venom of hymenoptera. *Amino Acids*, 43(5), 2047-2058

IF = 3,914

9. Slaninová, J., Mlsová, V., Kroupová, H., Alán, L., Tůmová, T., Monincová, L., Borovičková, L., Fučík, V., & Čeřovský, V. (2012). Toxicity study of antimicrobial peptides from wild bee venom and their analogs toward mammalian normal and cancer cells. *Peptides*, 33(1), 18-26

IF = 2,522

10. Pazderková, M., Kočiřová, E., Pazderka, T., Maloň, P., Kopecký, V., Monincová, L., Čeřovský, V., & Bednářová, L. (2012). Antimicrobial peptide from the eusocial bee halictus sexcinctus interacting with model membranes. *International Journal of Spectroscopy*, 27(5-6), 497-502

IF = 0,530

11. Čujová, S., Slaninová, J., Monincová, L., Fučík, V., Bednářová, L., Štokrová, J., Hovorka, O., Voburka, Z., Straka, J., & Čeřovský, V. (2013). Panurgines, novel antimicrobial peptides from the venom of communal bee panurgus calcaratus (hymenoptera: Andrenidae). *Amino Acids*, 45(1), 143-157

IF = 3,91

8. Přílohy

- Příloha 1:** Monincová, L., Buděšínský, M., Slaninová, J., Hovorka, O., Cvačka, J., Voburka, Z., Fučík, V., Borovičková, L., Bednářová, L., Straka, J., & Čerovský, V. (2010). Novel antimicrobial peptides from the venom of the eusocial bee *halictus sexcinctus* (hymenoptera: Halictidae) and their analogs. *Amino Acids*, 39(3), 763-775
- Příloha 2:** Monincová, L., Slaninová, J., Fucík, V., Hovorka, O., Voburka, Z., Bednářová, L., Maloň, P., Štokrová, J., & Čerovský, V. (2012). Lasiocepsin, a novel cyclic antimicrobial peptide from the venom of eusocial bee *lasioglossum laticeps* (hymenoptera: Halictidae). *Amino Acids*, 43(2), 751-761
- Příloha 3:** Monincová, L., Buděšínský, M., Čujová, S., Čerovský, V., & Veverka, V. (2014). Structural basis for antimicrobial activity of lasiocepsin. *ChemBioChem*, 15(2), 301-308
- Příloha 4:** Monincová, L., Veverka, V., Slaninová, J., Buděšínský, M., Fučík, V., Bednářová, L., Straka, J., & Čerovský, V. (2014). Structure-activity study of macropin, a novel antimicrobial peptide from the venom of solitary *Macropis fulvipes* (Hymenoptera: Melittidae). *Journal of Peptide Science*. 20(6), 375-384.

Příloha 1

Příloha 2

Příloha 3

Příloha 4